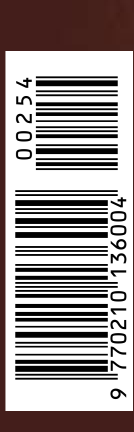
INVESTIGACION y CIENCIA

Edición española de SCIENTIFIC AMERICAN

Los nuevos fármacos

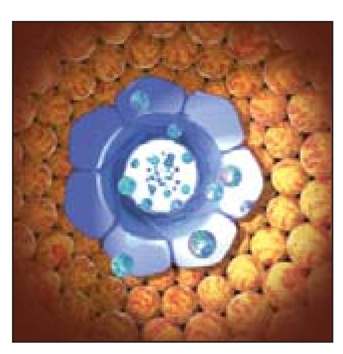


NOVIEMBRE 1997
1000 PTAS.



Noviembre de 1997 Número 254

SECCIONES



Portada: Keith Kasnot

PROCEDENCIA DE LAS ILUSTRACIONES

Página	Fuente
4	Xavier Lozoya
5-6	Angel Romo
7	Xavier Lozoya
13-14	Documentos PLS
16-18	Documentos PLS
21	Documentos PLS
23	Documentos PLS
26	Documentos PLS
33	Paul Ehrlich, Real Sociedad de Londres
34	P. R. Andrews *et al*., *Journal of Medical Chemistry*
35	H. J. Böhm, *Trends in QSAR and Molecular Modelling*
36	Brookhaven Data Bank
37	Gerd Folkers
38-40	Didier Rognan
41	H. J. Böhm *et al*., *Wirkstoffdesign*
43	George Pettit
44-51	BASF, Ludwigshafen
52-53	Tim Harris/Spektrum der Wissenschaft
54	Spektrum der Wissenschaft
55	Victor Colombo y Françoise Gerber
60	Spektrum der Wissenschaft
61	Slim Films/SdW
62-65	Laura Caleca (dibujos)
66	Cortesía de Giorgio Corsi/*Nature Medicine*
67-68	Laura Caleca
72	G. Santus y R. W. Baker
73	A. Gazzaniga *et al*., dibujo: Gabriella Marmorelli
74	Cortesía de Recordati S.p.A.
75	Cortesia de Roche
76-77	Gabriella Marmorelli
79	Cortesía de Bayer
84	E. Giovenzana, por cortesía de Ed. Skema
87	Cortesía de Medication Foundation/Asif Kamal
91	Colección *Ars Medica* del Museo de Arte de Filadelfia
92-94	Francisco J. de Abajo y Diego M. Gracia
95	Bernard E. T. Archive
96	F. J. de Abajo y D. M. Gracia
97	Dresdener Kunsthandel
98-99	F. J. de Abajo y D. M. Gracia
100	Patricia J. Wynne
101	Laurel Rogers
103-105	Jennifer C. Christiansen
106-107	Barry Ross

COLABORADORES DE ESTE NUMERO

Asesoramiento y traducción:

Ramón García Domènech: *La síntesis combinatoria*; Francesc Asensi: *Diseño racional de fármacos*; Dagmar Vedrilla: *Del laboratorio a la planta industrial*; José Mª Valderas Martínez: *Biotecnología de fármacos y Evaluación de la eficacia de los fármacos*; Ana Mª Rubio: *Las vacunas: los fármacos del futuro*; José M. García de la Mora: *Nuevas formas farmacéuticas*; Xavier Bellés: *Taller y laboratorio*; Luis Bou: *Juegos matemáticos*; J. Vilardell: *Hace...*, e *Ideas aplicadas*

INVESTIGACION Y CIENCIA

DIRECTOR GENERAL Francisco Gracia Guillén
EDICIONES José María Valderas, *director*
ADMINISTRACIÓN Pilar Bronchal, *directora*
PRODUCCIÓN M.ª Cruz Iglesias Capón
Bernat Peso Infante
SECRETARÍA Purificación Mayoral Martínez
EDITA Prensa Científica, S. A. Muntaner, 339 pral. 1.ª – 08021 Barcelona (España)
Teléfono (93) 414 33 44 Telefax (93) 414 54 13

SCIENTIFIC AMERICAN

EDITOR IN CHIEF John Rennie
BOARD OF EDITORS Michelle Press, *Managing Editor*; Philip M. Yam, *News Editor*; Ricki L. Rusting, Timothy M. Beardsley y Gary Stix, *Associate Editors*; Corey S. Powell, *Electronic Features Editor*; W. Wayt Gibbs; Kristin Leutwyler; Madhusree Mukerjee; Sasha Nemecek; David A. Schneider; Glenn Zorpette; Marguerite Holloway y Paul Wallich, *Contributing Editors*
PRODUCTION Richard Sasso
PUBLISHER Joachim P. Rosler
CHAIRMAN AND CHIEF EXECUTIVE OFFICER John J. Hanley

SUSCRIPCIONES

Prensa Científica S. A.
Muntaner, 339 pral. 1.ª
08021 Barcelona (España)
Teléfono (93) 414 33 44
Fax (93) 414 54 13

Precios de suscripción, en pesetas:

	Un año	Dos años
España	8.800	16.000
Extranjero	11.000	20.400

Ejemplares sueltos:

Ordinario: 800 pesetas
Extraordinario: 1.000 pesetas

—Todos los precios indicados incluyen el IVA, cuando es aplicable.

—En Canarias, Ceuta y Melilla los precios incluyen el transporte aéreo.

—El precio de los ejemplares atrasados es el mismo que el de los actuales.

DISTRIBUCION

para España:

MIDESA
Carretera de Irún, km. 13,350
(Variante de Fuencarral)
28049 Madrid Tel. (91) 662 10 00

para los restantes países:

Prensa Científica, S. A.
Muntaner, 339 pral. 1.ª – 08021 Barcelona
Teléfono (93) 414 33 44

PUBLICIDAD

GM Publicidad
Francisca Martínez Soriano
Menorca, 8, semisótano, centro, izquierda.
28009 Madrid
Tel. (91) 409 70 45 – Fax (91) 409 70 46

Cataluña y Baleares:
Miguel Munill
Muntaner, 339 pral. 1.ª
08021 Barcelona
Tel. (93) 321 21 14
Fax (93) 414 54 13

Difusión controlada 

ISSN 0210136X Dep. legal: B. 38.999 – 76

Filmación y fotocromos reproducidos por Dos Digital, Zamora, 46-48, 6ª planta, 3ª puerta - 08005 Barcelona
Imprime Rotocayfo, S.A. Ctra. de Caldes, km 3 - Santa Perpètua de Mogoda (Barcelona)

Printed in Spain - Impreso en España

Hace...

...cincuenta años

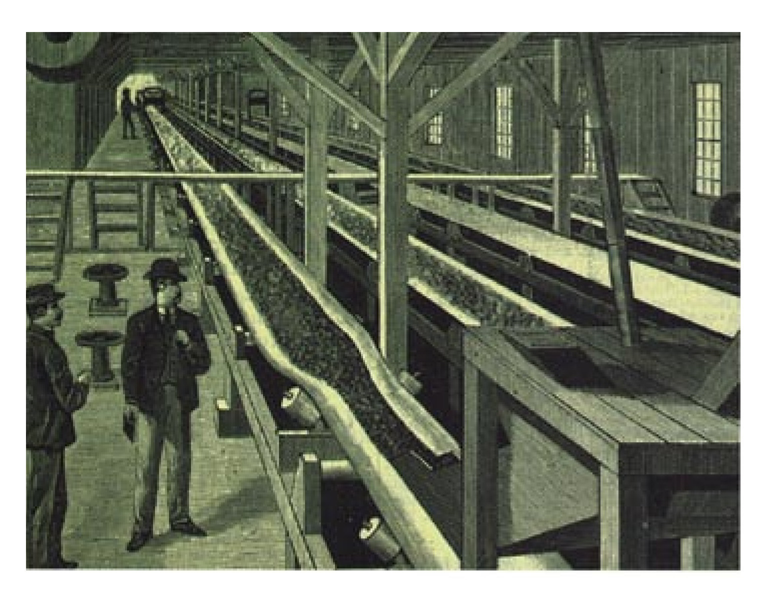
Refuerzo del empuje en los motores de chorro. «Instalado en la salida de la turbina de un motor de chorro normal, un dispositivo llamado 'posquemador' incrementa en más de un tercio el empuje del sistema propulsor en el despegue o en cualquier momento en que se requiera velocidad adicional. Basta, para ello, con derramar combustible dentro de la tobera final para que la combustión del mismo agregue masa e imprima velocidad a los gases de la corriente en chorro. El posquemador constituye, pues, un estatorreactor, en el que la velocidad del chorro de aire es muy superior a la necesaria para ponerlo en funcionamiento. Ese posquemador no impone esfuerzos adicionales de funcionamiento al turboreactor, característica ésta muy deseable ya que en este tipo de motores los materiales trabajan muy cerca de sus esfuerzos críticos.»

...cien años

Muerte por altura. «'Accidente alpino' es una expresión general que abarca a las víctimas de la caída en una grieta o en un torrente de montaña por 'pérdida del equilibrio', 'pasos en falso' o cualquiera de las infinitas desgracias que acechan en la práctica del montañismo. Sin embargo, la verdadera causa es el síncope (desmayo) producido por una lesión cardiaca. Esta hipótesis está reforzada por la muerte del burgomaestre de una ciudad de Westfalia, situada en el paso de Furka del glaciar del Ródano, quien puesto en pie en su carruaje para gozar mejor del panorama apenas llegó a decir 'Oh, c'est magnifique!' antes de caer muerto. La altura, el aire enrarecido, la caída de la tensión sanguínea, todas ellas condiciones inseparables de las ascensiones alpinas, resultaron excesivas para 'un enfermo cardiaco crónico.'»

Marconi: Ultimas novedades. «En los recientes experimentos realizados por el señor Marconi en La Spezia con su 'telegrafo senza fili' parece que se consiguió transmitir buenos telegramas y señales claras a través de más de treinta kilómetros. Se sujetó un alambre de cobre vertical al mástil, de casi tres metros de altura, de un barco. En tierra se levantó otro mástil de la misma altura a cuyo alambre vertical se unió el transmisor. Quedó asimismo de manifiesto que los aparatos receptores pueden instalarse sin miedo en lo más profundo de un barco de guerra acorazado, recibiéndose perfectamente los mensajes en una cabina situada a dos metros y medio por debajo del agua sin que la mole ingente de hierro circundante interfiera en absoluto.»

Transporte de grano. «La descomunal cosecha de trigo que se espera este año de 1897 en América supera los 17 billones de litros. Pero en Europa las cosechas se han venido abajo en una desastrosa temporada. Por ello el Viejo Mundo necesitará más de 7 billones de litros de nuestro trigo. En el transporte de tanta carga saldrán beneficiadas las compañías transoceánicas. Los sistemas mecánicos actualmente empleados para mover el grano dentro del puerto de Nueva York han demostrado su gran valor como ahorradores de tiempo y costo y son capaces de manejar grandes cantidades de trigo. Nuestra ilustración muestra las poderosas cintas transportadoras que trasladan el grano a bidones de almacenamiento e incluso directamente a las bodegas de los vapores transatlánticos que lo esperan.»



Sistemas mecánicos para el transporte de grano

...ciento cincuenta años

Té indio. «Nos informa *La Gaceta* de Calcuta del gran éxito alcanzado por el cultivo del té en el noroeste de la India. El clima y la tierra de Kemaún son tan favorables al desarrollo de la planta como puedan serlo los de las mejores localidades chinas. Además, los comerciantes de té ingleses han declarado que el té indio es parejo al chino de la mejor calidad, poseyendo el aroma de los naranjos. El precio del cultivo de té es tan bajo, que anima las inversiones de capital. Las más de 40.000 hectáreas disponibles para el cultivo del té sólo en Dhoon podrían rendir hasta más de 3400 toneladas, equivalentes a una sexta parte de todo el consumo de Inglaterra.»

Electricidad por luz solar. «El padre Maces, profesor de Historia Natural del Colegio de La Paz (Nemour), acaba de hacer un descubrimiento de la mayor importancia científica. En una nota del boletín de la Real Academia se anuncia la conversión de luz solar en electricidad. Este sencillísimo aparato habló varias veces bajo la influencia de la luz y en ausencia de ésta permaneció mudo. Ni siquiera delante del fenómeno nadie se atreve a dar crédito a sus ojos, pese a lo patente de las señales eléctricas.»

Camisas. «Se ha registrado una patente que prescinde del cosido en la manufactura de camisas, cuellos y artículos de ropa. Las piezas componentes se unen mediante una cola insoluble.

Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy

Más que un regreso a la herbolaria tradicional, lo que presenciamos es la revalorización de las mismas plantas medicinales, aunque bajo una interpretación científica rigurosa

Xavier Lozoya

La cuarta parte, si no más, de los fármacos empleados hoy en los países industrializados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales. Es una tendencia creciente con un inesperado doble punto de partida: la farmacopea tradicional (los remedios de la abuela) y los sistemas de sanación de los pueblos indígenas. Hasta comienzos del siglo pasado había una notable coherencia sobre los fármacos empleados. Una rebotica del siglo XVIII no difería mucho de otra del siglo XIII, si exceptuamos los fármacos procedentes del Nuevo Mundo, como el bálsamo del Perú, guayaco, zarzaparrilla o el tabaco.

Cierto es que la medicina académica se fue apartando, sobre todo desde la época de la revolución científica, de las prácticas de los curanderos tan arraigadas en el pueblo llano. Pero no era una separación tajante. En 1775, William Withering, médico inglés, le oyó contar a un curandero que las hojas de *Digitalis purpurea* eran muy eficaces para el tratamiento de la hidropesía, trastorno producido por el bombeo deficiente del corazón. Al tratar a sus pacientes de hidropesía con las hojas, Withering descubrió en ellas un poderoso efecto cardiotónico. Desde entonces se han aislado, a partir de *D. purpurea*, 30 glicósidos cardíacos, entre ellos la digitoxina, la digoxina y la digitoxigenina. Hoy sabemos que la *Digitalis* inhibe una enzima que moviliza el transporte de los iones sodio y potasio a través de las membranas celulares, la ATPasa de Na^+/K^+.

Para llegar a la situación actual hubo que seguir un camino de ida y vuelta. En su explicación de la evolución de la terapéutica, antropólogos e historiadores de la medicina trazaron un esquema rígido, lineal y ascendente, que colocaba, en el vértice, el quehacer médico de los países desarrollados. Pero ese enfoque ha empezado a cambiar. Hoy se admite la coexistencia histórica de distintas pautas o modelos culturales, cada uno de ellos con una peculiar visión acerca de la enfermedad en su conjunto y, por tanto, con un manejo diverso de los recursos curativos.

Dentro de esa tendencia, las "medicinas tradicionales" fueron reconocidas, en los años setenta, por la Organización Mundial de la Salud, lo que confirió un poderoso impulso a la investigación, en particular, de plantas medicinales. De manera complementaria, los avances en zoofarmacognosia han puesto de manifiesto que ciertos primates, los chimpancés por ejemplo, emplean de forma selectiva plantas medicinales cuando se sienten enfermos, mostrando así que la selección y uso de vegetales medicinales con la consecuente transmisión del conocimiento a los demás miembros de una especie no es característica exclusiva de los humanos.

Esta vuelta a los herbarios de rebotica no significa ningún retroceso. Para entenderlo conviene dar cierta perspectiva histórica y espacial a la situación en que nos encontramos. Lo primero que salta a la vista es que las estrategias seguidas por la investigación y los laboratorios farmacéuticos de Occidente difieren de las seguidas en Oriente. A lo largo de los últimos 20 años, los fármacos de origen natural que han salido al mercado son, en proporción abrumadora, resultado de las investigaciones realizadas en China, Corea o Japón. La contribución occidental en nuevos medicamentos de origen vegetal es, para el mismo período, menor. ¿A qué obedece esta diferencia?



La estrategia seguida por Occidente para la producción de medicamentos ha venido determinada por dos factores principales: las dos guerras mundiales y el establecimiento de los sistemas de seguridad social. Respecto al primero, los gobiernos hubieron de hacer frente a la necesidad de grandes cantidades de medicamentos para atender a los combatientes y a la población civil, víctima de los bombardeos en las ciudades densamente pobladas. Además, la implantación de sistemas de seguridad social motivó la demanda de fármacos para proveer a los médicos (miles de profesionales liberales convertidos en asalariados de las instituciones gubernamentales de salud) con los medicamentos requeridos por la asistencia más o menos gratuita para los ciudadanos.

Ambos factores obligaron a los laboratorios farmacéuticos a abordar nuevas estrategias de producción, lo que significó un replanteamiento del papel que las plantas medicinales venían desempeñando en su elaboración. La industrialización de los medicamentos de origen vegetal había comenzado ya en los últimos decenios del siglo pasado como un fruto más del desarrollo de la química alemana y francesa, sobre todo. En esa época surgieron los primeros laboratorios farmacéuticos, que producían medicamentos en forma de jarabes, extractos, tinturas, pomadas y emplastos. Para los habitantes de las ciudades, en pleno desarrollo y expansión, resultaba poco práctico el uso tradicional de infusiones y tisanas medinales elaboradas con las plantas que crecían espontáneas.

Esta incipiente industria farmacéutica productora de extractos de valeriana, quina, digital, ipecacuanha, amapola, cornezuelo del centeno, entre otros medicamentos galénicos, reconocía la importancia histórica de los recursos naturales, se apoyaba en la farmacognosia (conjunto de conocimientos de botánica taxonómica, anatomía microscópica vegetal, química orgánica y fisiología) y se sustentaba en los procesos extractivos practicados mediante el uso de disolventes orgánicos de distinta polaridad.

Esta industria procuraba, hasta donde la técnica finisecular lo permitía, generar el mayor volumen de productos a partir de una materia prima importada o fácil de obtener. Los habitantes de las ciudades compraban a precios elevados los fármacos recetados por los médicos. Sin embargo, resultó imposible fabricarlos en las cantidades requeridas por el nuevo mercado que establecieron la guerra y la seguridad social, ya entrado el siglo XX. El caso que sirvió de ejemplo para dar solución a ese problema fue el de la aspirina.

A partir del éxito que representó la síntesis del ácido acetilsalicílico y el consecuente desplazamiento de los salicilatos descubiertos en la corteza del sauce, se propuso una nueva estrategia para la obtención de medicamentos: la síntesis total de los principios activos presentes en las plantas y el diseño de derivados más eficaces o potentes. La aspirina, producida en el laboratorio, resolvía un importante problema vinculado a la fabricación de fármacos de origen vegetal: el cultivo o la extracción de la materia prima vegetal resultaban innecesarios. En aquel entonces, los cultivos de plantas medicinales se realizaban frecuentemente en el trópico.

La estrategia sintética ofrecía otras ventajas. La fabricación en masa rebajaba el coste del producto final, lo que prometía un futuro de medicamentos baratos para todos, a la par que sustanciosas ganancias para las empresas. Además, la

XAVIER LOZOYA dirige el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales en el Centro Médico Nacional Siglo XXI perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México. Ha consagrado veinte años de su vida al estudio de la farmacología de las plantas medicinales y ha impulsado la valoración científica de la medicina tradicional mexicana, en particular del conocimiento indígena prehispánico.



1. PLANTAS DE LA MEDICINA POPULAR que siguen teniendo amplio uso, ahora con mayor razón tras haberse estudiado mejor el mecanismo de acción de sus principios activos: un antimigrañoso en *Tanacetum parthenium* (*a*), un sedante en *Valeriana officinalis* (*b*) y un antidepresivo en *Hypericum perforatum* (*c*).





2. ENTRE LAS PLANTAS MEDICINALES CLASICAS venidas de Oriente destaca *Ginkgo biloba*, una suerte de "fósil" de la que se extraen terpenos peculiares. Se indica para tratar el asma.

dosificación del producto resultaba cómoda y, sobre todo, precisa, lo que posibilitaba un mejor control de la medicación y, por ende, del tratamiento. El desconocimiento de la toxicidad y del mecanismo de acción de la aspirina no impidió que el ácido acetilsalicílico inaugurara el mercado masivo y mundial de los nuevos productos farmacéuticos. (El modo de acción de la aspirina no se conoció hasta la década de los años ochenta cuando hicieron su aparición las prostaglandinas, es decir, casi cien años después de la identificación del ácido acetilsalicílico.)

La ciencia de comienzos de siglo suponía que, una vez conocido el principio activo de una planta medicinal, ésta dejaba de tener importancia comercial. Se creyó que las plantas medicinales contenían, por lo general, un solo principio activo y que los demás metabolitos secundarios del vegetal eran innecesarios para el efecto curativo. La química progresaba y el sistema métrico decimal abandonaba el territorio de los gramos para presumir precisión en miligramos y soñar con los microgramos. Así, el extracto, la tintura, la poción o la infusión de rebotica fueron pasando a la historia de la farmacia como productos inseguros, difíciles de cuantificar y, sobre todo, porque los medicamentos galénicos eran mezclas de demasiados componentes y su acción resultaba difícil de evaluar.

Se pensó que, con el tiempo, todos estos productos podrían sustituirse con las cápsulas, tabletas e inyectables elaborados con el compuesto puro, con el elemento biológicamente activo identificado en la planta. Así, el químico-farmacéutico sustituyó al farmacognosta, la fitoquímica engendró a la quimiotaxonomía y la propuso como guía para adentrarse en las selvas tropicales en búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal. La medicina extirpó de sus programas de estudio materias como la farmacognosia, la botánica taxonómica y otras antiguallas decimonónicas. El médico debía acostumbrase a utilizar el "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas Comerciales", el *Vademécum*, cuya edición y permanente actualización estarían siempre patrocinadas por la industria.

Este desinterés por la investigación de las plantas medicinales y el empuje de los específicos de las industrias que esperaban ingentes ganancias si lograban abastecer al mercado masivo con medicamentos sintéticos, caracterizaron el paradigma científico que prevaleció a lo largo de decenios en el estudio y desarrollo de fármacos. De no haber surgido los antibióticos (procedentes de diversas especies de hongos) en los años cuarenta, los laboratorios farmacéuticos se hubieran derrumbado estrepitosamente ya que su estrategia de sintetizar los principios activos de los extractos de plantas no tuvo el éxito esperado. La revolucionaria y sorprendente eficacia de los antibióticos, en particular de la penicilina y sus congéneres, hizo realidad el sueño científico y económico de la industria y el paradigma científico diseñado por la industria químico-farmacéutica se convirtió en dogma en las universidades.

En el mundo académico, nos encontramos en los años cuarenta, prendió el siguiente razonamiento: el empleo de plantas medicinales constituía una práctica empírica realizada por herboristas, comadronas o charlatanes, gente de poca o nula educación; utilizar esos recursos en la forma vulgar en que se conocen pone en riesgo la salud de la población; sólo a través de un minucioso proceso de investigación se puede garantizar la seguridad del paciente y la precisa (por cuantitativa) utilización de los medicamentos extraídos de las plantas.

Esta visión del proceso de investigación determinó, a su vez, los pasos metodológicos a seguir. Primero, habría que seleccionar un vegetal idóneo; para ello, el camino más racional era utilizar la quimiotaxonomía que ayuda a detectar en qué parte del planeta puede existir la flora ideal para encontrar el producto previsto. Un segundo paso consistiría en realizar un análisis fitoquímico de los compuestos presentes en el vegetal, extrayendo y aislando las moléculas de interés; de preferencia, las que pertenezcan a grupos químicos de demostrada acción biodinámica, como son, por ejemplo, los alcaloides. A continuación, habría que diseñar un modelo de experimentación farmacológica animal en el cual ensayar los compuestos puros extraídos del vegetal; de detectarse alguna acción biológica útil, se procedería a sintetizar el compuesto para su estudio farmacológico, toxicológico y farmacéutico. Por último, se iniciarían los estudios clínicos, con sus respectivas fases que garantizaran la eficacia y seguridad del compuesto descubierto.

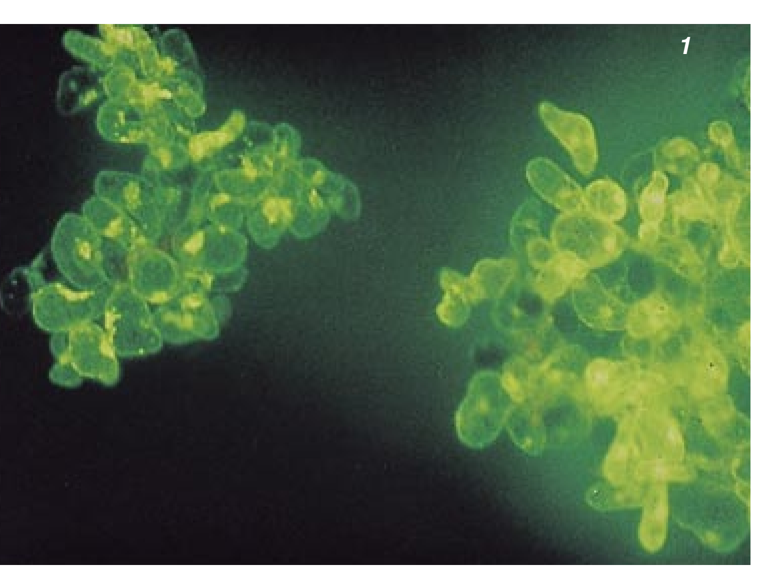
El siguiente capítulo se escribió con una planta de la flora mexicana, que los nativos de las selvas de Veracruz llaman barbasco, tubérculo de la *Dioscorea composita*. Ellos lo emplean para envenenar los esteros y lagunas. El agua embarbascada por la raíz se torna jabonosa y mata a los peces que aparecen en la superficie. Los fitoquímicos aislaron e identificaron el principio tóxico, la diosgenina, a partir de la cual se sintetizaron los esteroides dando nacimiento al mercado farmacéutico masivo de hormonas. Durante los años

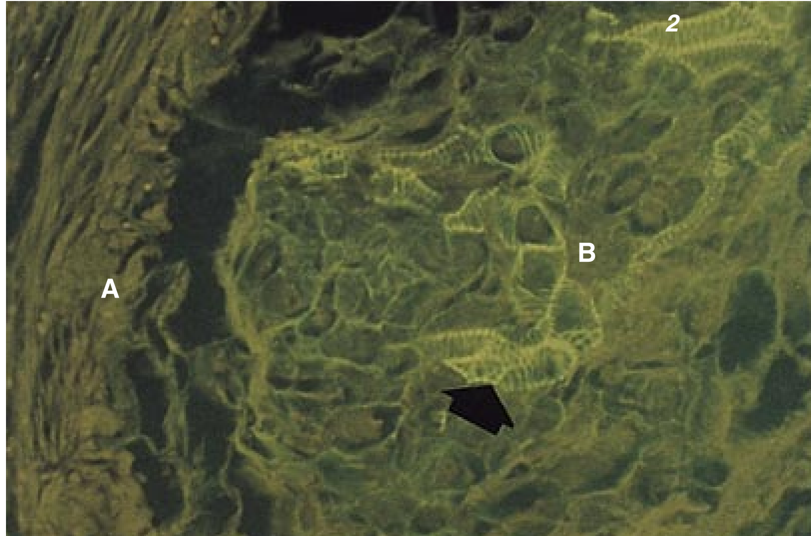
cuarenta y cincuenta, la investigación farmacéutica se centró en esos dos grandes campos: los antibióticos y las hormonas, con sus correspondientes derivados sintéticos.

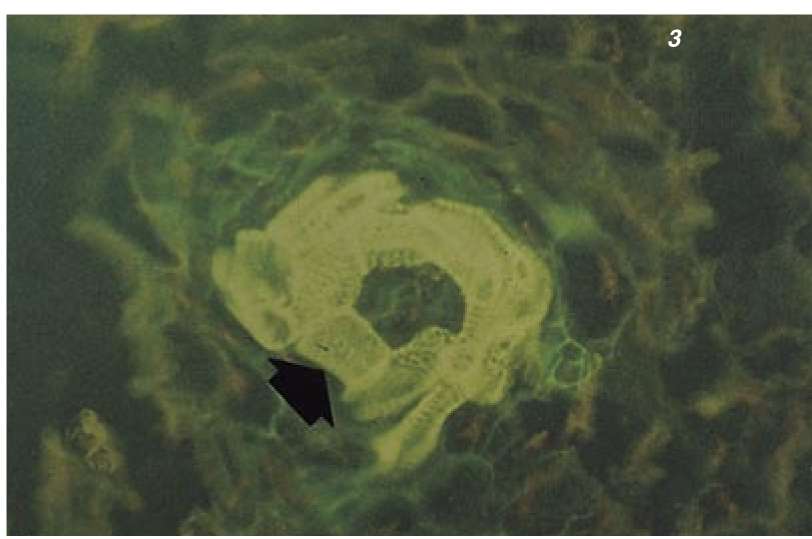
No obstante el progreso de la química de síntesis, su prometedora aplicación al desarrollo de fámacos encontraba más resistencia de la esperada. N. R. Farnsworth, de la Universidad de Chicago, ha demostrado que, del total de prescripciones extendidas por los médicos en los Estados Unidos de 1959 a 1980, cerca del 30 % contenía extractos de vegetales o principios activos obtenidos de plantas superiores. Por lo menos 119 compuestos modernos se obtenían directamente de 91 especies botánicas ya conocidas y que requerían cultivo. Se extraía la materia prima, se purificaba el principio activo y la forma farmacéutica establecía la diferencia.

Pero se habían producido muy pocos medicamentos realmente nuevos. La vincristina y la vinblastina obtenidas de *Catharanthus roseus*, útiles para el tratamiento de la leucemia, eran el único hallazgo importante en varios decenios. Algunas instituciones gubernamentales, como el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU., habían patrocinado durante años el estudio sistemático de compuestos extraídos de plantas medicinales recolectadas en todo el mundo en la búsqueda de nuevos medicamentos antitumorales. Sin embargo, después de someter miles de esos productos a pruebas de citotoxicidad mediante la técnica de rastreo ("screening") *in vitro*, los resultados eran poco alentadores. El resto de los productos medicinales de origen natural que se utilizaban en la medicina occidental provenían de la misma herencia obtenida del siglo pasado. Laxantes de *Cassia senna* y *Plantago indica*, cardiotónicos de *Digitalis purpurea*, antiamebianos de *Cephaelis ipecacuanha*, sedantes de *Valeriana officinalis*, antiespasmódicos de *Atropa belladona*, antipalúdicos de *Cinchona calisaya*, reserpina de *Rauvolfia serpentina*, etcétera.

Al inicio de los años setenta, se produjo el cambio que, a la postre, modificaría el paradigma científico en torno a la investigación de plantas medicinales, cuando la Organización Mundial de la Salud empezó a prestar atención a los éxitos alcanzados por China en la solución de sus problemas de atención primaria de la salud. La tasa de mortalidad que en 1949 era de 25 por cada 1000 habitantes, en 1970 era de 6,2 por 1000; el índice de mortalidad infantil que en 1949 era de 200 por 1000, bajó en 1970 a 12 por 1000. En el esquema empleado por China, el uso de plantas medicinales tenía una importancia determinante. Con las plantas habían logrado ser







3. TRASPLANTE DE CELULAS VEGETALES en tejido animal. En 1993 se realizó el primer trasplante subcutáneo en ratas de células vegetales. Se extrajeron células de *Mimosa tenuiflora*, especie medicinal con propiedades cicatrizantes, se sometieron a cultivo *in vitro* y se injertaron bajo la piel de los múridos. Durante las primeras semanas, se produjo cierta reacción inflamatoria inespecífica que se advirtió en la proliferación de células polimorfonucleares y macrófagos en torno a las células trasplantadas. Tal respuesta no impidió la supervivencia de las células vegetales, que fueron segregando el principio activo. Estos experimentos respaldan la hipótesis de una potencial utilización de los trasplantes para la inoculación directa de fármacos. Las ilustraciones revelan la evolución del comportamiento de las células trasplantadas. En la microfotografía 1, las células se encuentran todavía sin diferenciar a los tres meses de haberse trasplantado; tres meses más tarde, diapositiva 2, las células han iniciado ya un proceso de diferenciación en forma de traqueidas fluorescentes (A, cápsula de colágeno; B, tejido vegetal injertado), y tres meses después, es decir a los nueve del trasplante, las células vegetales se han organizado y diferenciado hacia la formación de vasos.

autosuficientes en medicamentos e impulsar los programas de salud para una población muy numerosa.

Su política de industrialización de los medicamentos difería de la seguida por Occidente y le había permitido atender los requerimientos básicos de una población de casi mil millones de habitantes, equivalente a la de toda Europa Occidental y Norteamérica juntas. El modelo chino hacía uso de la medicina autóctona y de la herencia médica occidentalizada que les había dejado su intermitente vinculación con el resto del mundo. El resultado era una combinación pragmática de recursos médicos que resultó altamente eficaz: tisanas de yerbas, rayos X, acupuntura y antibióticos. Las plantas medicinales chinas, de ancestral uso en la medicina tradicional, se habían sometido a un proceso de industrialización (creándose numerosas agroindustrias estatales) para producir fármacos sencillos y económicos que, si bien recordaban a las preparaciones galénicas de Occidente, a diferencia de éstas contaban con un amplio bagaje informativo de investigación clínica moderna.

La estrategia en Oriente partía de un principio básico: el reconocimiento del valor intrínseco de su propia cultura médica y del conocimiento sobre la utilidad curativa de las plantas que se preservaba durante milenios. La ciencia practicada por los chinos del siglo XX buscó corroborar y ampliar ese conocimiento popular; para ello, incorporaron el herbolario en la medicina oficial, con lo que, además de resolver la necesidad de abasto, permitió la valoración clínica de centenares de plantas medicinales recomendadas por la tradición. Sin dejar de reconocer la necesidad de contar con una permanente investigación química y farmacológica de los productos herbolarios usados por la población, se optó por realizar su evaluación clínica, primer paso para seleccionar los recursos vegetales que deberían investigarse. En otras palabras, se invirtió el método de investigación: primero se confirmó la utilidad terapéutica del extracto, tisana o poción de uso popular, y, a partir de la información clínica obtenida, se desarrolló el nuevo medicamento con estudios químicos y farmacológicos complementarios.

La estrategia china llevó al descubrimiento de varios aspectos importantes de la farmacología y la química de los medicamentos de origen natural.

Fitofármacos de mayor demanda en el mercado de productos medicinales

En la actualidad, los productos medicinales elaborados con plantas suelen ser extractos crudos, fracciones cromatográficas, mezclas o conjuntos de compuestos cuya acción farmacológica depende de la combinación de los principios activos obtenidos del vegetal, configurando una nueva categoría de productos: los llamados *fitofármacos*.

Planta	Efecto comprobado	Uso en
Allium sativum	reduce la agregación plaquetaria	arterioesclerosis y disfunción plaquetaria
Arnica montana	antiinflamatorio	golpes y lesiones
Artemisia annua	antiparasitario	malaria
Angelica sinensis	hepatoprotector	hepatitis y cirrosis hepática
Astragalis radix	inmunoestimulante	gripe
Centella asiatica	activa colágeno I	heridas y quemaduras
Crataegus oxyacantha	mejora la permeabilidad vascular	enfermedades cardiovasculares
Echinaceae purpurea	inmunoestimulante	infecciones respiratorias
Ginkgo biloba	antioxidante	insuficiencia cerebrovascular
Glycyrrhiza glabra	activa prostaglandinas	úlcera gástrica y duodenal
Matricaria chamomilla	inhibe prostaglandinas y leucotrienos	inflamación visceral
Opuntia ficus-indica	hipoglucemiante	diabetes mellitus
Panax ginseng	adaptógeno y tónico	debilitamiento y estrés
Plantago psyllium	hipocolesterolemiante	prevención de infarto
Psidium guajava	antagonista del calcio	antidiarreico
Tanacetum parthenium	antiserotoninérgico	migraña
Thymus vulgaris	antimicrobiano	faringitis y amigdalitis
Zingiber officinale	antiserotoninérgico	migraña y mareo

El efecto biodinámico de un extracto dependía de la época de recolección del vegetal. Los efectos medicinales podían ser antagónicos. En la mayoría de los casos, el vegetal contenía un conjunto de principios activos y la acción de cada compuesto por separado no correspondía a la suma de los compuestos químicamente parecidos: la mezcla era superior al producto puro y aislado. Los principios activos solían extraerse de fracciones químicas altamente solubles en agua, por lo que su separación e identificación era difícil en comparación con los productos de baja polaridad; familias químicas de compuestos hasta entonces consideradas inertes tenían vigorosa actividad farmacológica, caso de los flavonoides, pigmentos, taninos y otros productos que se perdían por el desagüe del laboratorio con la estrategia opuesta.

Uno de los mejores ejemplos de la acertada estrategia seguida por China fue la investigación de la *Artemisia annua* (qinghao), medicamento antimalárico que vino a resolver el problema de la resistencia a la quinina y a sus derivados. La investigación se inició con la utilización del extracto original, según las fuentes de medicina tradicional china. En 1973 se realizaron las observaciones clínicas administrando por la vía oral el extracto a 2099 enfermos que padecían malaria. Esto se hizo bajo un estricto control médico en 12 hospitales; el 98 % de los pacientes se curó. Frente a tan contundente resultado y reuniendo una detallada información clínica sobre el efecto observado, se aisló el compuesto activo en los seis siguientes meses de trabajo. En sintetizar el compuesto y varios derivados se tardó otro año.

Cuatro años después se conoció el mecanismo de acción de los productos obtenidos y se industrializaron los derivados más eficaces, artemisinina y arthemeter, este último capaz de curar la malaria cerebral por vía endovenosa.

En el informe final, publicado en 1979 en *Chinese Medical Journal*, se podía leer: "El qinghao se ha utilizado en China durante 2000 años. Su primera descripción se remonta al libro *Shennong Bencao Jing*, publicado en el siglo 1-2 a.C. y hay testimonios escritos de su empleo con fines a lo largo de casi un milenio en las obras de medicina tradicional china. Su acción antimalárica se redescubrió en 1971 d.C. y se desarrolló un medicamento moderno aún más eficaz."

El desarrollo de medicamentos bajo la estrategia oriental no se limitó a la utilización del principio activo obtenido de una planta cuyo uso en la medicina tradicional estuviera bien documentado, sino que también incluyó la valoración de las plantas en uso por la población actual. Esto dio como resultado el surgimiento de una industria fitoterapéutica que comercializó los extractos, tisanas, mezclas y combinaciones de yerbas que habían sido corroborados por los estudios realizados en los hospitales directamente en los pacientes y después investigados química y farmacológicamente.

Así surgieron en unos cuantos años el DS-201 (extracto de *Salvia miltiorrhiza*) para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, el TMPZ-2 (extracto de *Ligusticum chuanxiong*) para el tratamiento de la angina pectoris, el de *Crataegus oxyacantha* para accidentes cerebrovasculares, el dang-gui (extracto de *Angelica sinensis*) para el tratamiento de la isquemia, la changrolina (antiarrítimico), la indirubina (antileucémico), el bu-wang (anticolesterolemiante) y muchos otros que han ido configurando un nuevo grupo de medicamentos que reciben hoy el nombre genérico de medicamentos herbolarios ("soft herbal remedies") o fitofármacos.

La influencia de este modelo de investigación ha venido sintiéndose en otros países, primero en el continente asiático y después en Europa. Con el nacimiento de la etnobotánica se consolidó una tendencia universitaria que criticaba el abandono en que se encontraba la flora medicinal y el desinterés por el estudio de las prácticas populares y el uso de plantas medicinales. Impulsados por los hallazgos de China y bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud, que creó en 1975 el Programa de Promoción y Desarrollo de las Medicinas Tradicionales, miles de jóvenes biólogos de Africa, Asia e Iberoamérica se lanzaron al rescate de las culturas médicas autóctonas.

Por su parte, en las universidades europeas y algunas norteamericanas surgieron grupos que estudian etnofarmacología, etnobotánica o etnomedicina, bajo la consigna de devolver a la medicina occidental su vinculación con la naturaleza y su fundamento cultural. La investigación científica de las plantas medicinales en Occidente incorporó a su metodología el avance técnico que se había producido en el campo de la química (cromatografía de líquidos de alta resolución y sistemas de separación y espectrometría en línea), de la biología celular (cultivo biotecnológico de células vegetales y producción de compuestos en reactores) y de la biología molecular (determinación de receptores celulares y campos biodinámicos con sondas y marcadores).

En Alemania vuelve a revalorizarse clínicamente la manzanilla (*Matricaria recutita*), aplicándola también como antiinflamatorio y adaptógeno (así se califica el fármaco que provoca un aumento inespecífico de las defensas del organismo ante agentes estresantes). En Inglaterra se recupera la tisana de tanaceto (*Tanacetum parthenium*) para aliviar las migrañas y se descubre el modo de acción de sus lactonas sobre el mecanismo serotoninérgico que desencadena, desde las plaquetas, el ataque migrañoso. Los polisacáridos de *Echinacea purpurea* resultan útiles, como se demostró clínicamente, para aumentar la capacidad inmunodefensiva frente a infecciones como el resfriado común y trastornos víricos. *Hypericum perforatum* se promueve como inhibidor de la monoaminooxidasa (MAO) con efectos antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos, si bien la acción de varios de sus principios activos es aún desconocida.

El extracto de *Ginkgo biloba* ha alcanzado una difusión mundial para el tratamiento de trastornos cerebrovasculares, depresión y enfermedad de Alzheimer; se elabora y dosifica a partir de la concentración de un conjunto de flavonoides. Desde el Tercer Mundo, surge *Psidium guajava*, la popular guayaba en uso desde épocas prehispánicas, como medicamento para controlar la diarrea y la colitis nerviosa, mientras la uña de gato (*Ononis spinosa*) cobra fama de medicamento antirreumático. Sin embargo, y a pesar de los avances en las técnicas de extracción, separación (técnicas cromatográficas) e instrumentación analítica y espectroscópica, sabemos todavía muy poco sobre el metabolismo secundario de la mayoría de las especies vegetales superiores, sobre todo de las de las floras de la pluviselva tropical.

La biotecnología ha entrado ya en el dominio de las plantas medicinales. Y así se han ensayado los trasplantes de células vegetales en organismos animales con el fin de lograr que aquéllas ejerzan su acción curativa en éstos. Los trasplantes entre reinos han mostrado que las células vegetales podrían funcionar como "biobombas", segregando compuestos activos en el torrente sanguíneo o en los órganos diana de un animal. Células de plantas medicinales, preparadas *in vitro* e injertadas luego en un animal de laboratorio, permanecen metabólicamente viables durante meses en el cuerpo de un animal. Además, según hemos demostrado en mi laboratorio del Instituto Mexicano del Seguro Social, la respuesta inmunitaria del huésped no impide la supervivencia y adaptación del tejido vegetal.

El mercado de los fitofármacos ha llegado para quedarse por largo tiempo. ¿Es un regreso a las plantas medicinales? Para algunos pueblos sí, para otros no. Para la ciencia médica, definitivamente no. El abordaje de la investigación de plantas medicinales se modificó en la medida en que el progreso de la técnica permitió otros accesos para construir nuevos paradigmas.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

MEDICINAL PLANTS IN THERAPY. N. R. Farnsworth, O. Akerele, *et al.* en *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6):965-981; 1985.

ETHOPHARMACOLOGICAL INVESTIGATION IN CHINESE MEDICINAL PLANTS. CIBA Foundation Symposium 185, John Wiley & Sons en *Ethnobotany and the Search for New Drugs*, págs. 169-178; Nueva York, 1994.

SURVIVAL OF CULTURED PLANT-CELLS GRAFTED INTO THE SUBCUTANEOUS TISSUE OF RATS. X. Lozoya, I. Madrazo, *et. al.* en *Archives Medical Research*, 26(1):85-89; 1995.

Química médica

Durante mucho tiempo la química obtenía por tanteo los medicamentos a partir de cabezas de serie. Ahora podemos ya proyectar estos compuestos activos

Georges Teutsch

¿Qué se entiende por química médica? En otro tiempo se proyectaban moléculas de las que todo se ignoraba buscando conseguir un efecto preciso sobre un organismo del que no se sabía gran cosa. Semejante situación pertenece ya al pasado. Los químicos de especialidad médica elaboran productos de características farmacológicas bien determinadas que constituyen la base de los medicamentos.

Todo organismo vivo es un sistema químico, en el que se puede influir introduciendo moléculas externas, o bien modificando por medios no químicos el equilibrio de sus moléculas internas. Esta última solución está poco explorada, pero se sabe, por ejemplo, que la secreción de ciertas moléculas del organismo —moléculas endógenas— varía con la iluminación o con la estación; modificando la cantidad de luz recibida por un enfermo se gobierna la liberación de melatonina, la hormona segregada por la glándula pineal.

Interviene también el psiquismo, las emociones en particular, sobre la descarga de adrenalina. La secreción de prolactina, hormona de la lactación, es muy sensible a los estímulos táctiles. También sabemos que la formación ósea depende de estímulos mecánicos, lo que explica la rápida pérdida de masa ósea de los astronautas sometidos a microgravedad. Igualmente puede imaginarse que la acupuntura provoca modificaciones locales, e incluso generales, de las concentraciones en ciertas moléculas endógenas. No olvidemos en fin el efecto placebo, tan poderoso que los farmacólogos se ven siempre obligados a comparar los nuevos medicamentos con moléculas desprovistas de actividad biológica.

GEORGES TEUTSCH es responsable del programa de química combinatoria en el Centro de Investigación de la Sociedad Roussel-Uclaf.

La química médica en sí se desentiende de estos fenómenos para dedicarse exclusivamente a la medicación química directa. Un químico médico es ante todo un químico comprometido en el diseño y la realización de moléculas nuevas, dotadas de propiedades farmacológicas definidas. Su labor no difiere esencialmente de la de un químico de materiales, ya que también busca crear una materia que tenga propiedades determinadas: en vez de la resistencia, flexibilidad o ligereza serán éstas la actividad biológica, selectividad, y biodisponibilidad, entre otras. En ambos casos se mantiene un diálogo permanente entre la exploración de las estructuras moleculares y las pruebas de evaluación de la actividad de los productos. De este modo la química médica viene a ser una síntesis entre la química, la bioquímica de las dianas terapéuticas (vías de señalización, sistemas enzimáticos), la fisiología (absorción, distribución, metabolismo, excreción) y la toxicología.

Sacar nuevo de lo viejo

Uno de los caminos más seguidos por los químicos médicos es la modificación de los principios activos. En el Centro de Investigación de la Sociedad Roussel-Uclaf, por ejemplo, hemos adoptado este enfoque en el caso de las hormonas esteroideas. Comparten éstas con el colesterol un núcleo llamado esterano, compuesto de tres ciclos con seis átomos de carbono y un ciclo con cinco átomos de carbono. A partir del colesterol los organismos animales sintetizan cortisol (fabricado por las glándulas suprarrenales) y progesterona (secretada por el cuerpo lúteo y la placenta, asegura la anidación del huevo e interviene en el proceso del embarazo). Cortisol y progesterona son hormonas esteroideas.

Estos compuestos están presentes en la sangre y en la orina, pero en concentraciones demasiado débiles para satisfacer las necesidades terapéuticas (salvo en el caso de los estrógenos, que todavía se extraen de la orina de las yeguas preñadas).

Tras haber aislado la cortisona, a finales de los años 30, y comprobado su actividad antiinflamatoria diez años más tarde, la industria farmacéutica buscó análogos más activos o más selectivos de esta molécula. Para ello, conservando el esqueleto de base, los químicos médicos modificaron todas las posiciones que les eran entonces accesibles: sustitución de enlaces simples por enlaces dobles entre dos átomos de carbono contiguos, sustitución de ciertos átomos de hidrógeno por átomos de halógenos (flúor, cloro, bromo o yodo) o por grupos de átomos que modifican la solubilidad en el agua o en las grasas, adición de ciclos que contienen átomos distintos del carbono, etcétera. Este juego de pruebas y errores hizo aparecer toda una gama de antiinflamatorios cortisónicos, al mismo tiempo que estableció un conjunto de relaciones cualitativas entre las estructuras moleculares y la actividad biológica de las moléculas.

1. LOS BANCOS de estructuras tridimensionales de moléculas estudiadas por cristalografía en rayos X permiten la concepción y la optimización razonadas de los principios activos. Aquí interacciona penicilina con la enzima de una bacteria. Estudiando el anclaje de las dos moléculas pueden inventarse penicilinas modificadas, capaces de acabar con bacterias que habían adquirido resistencia contra los antibióticos.

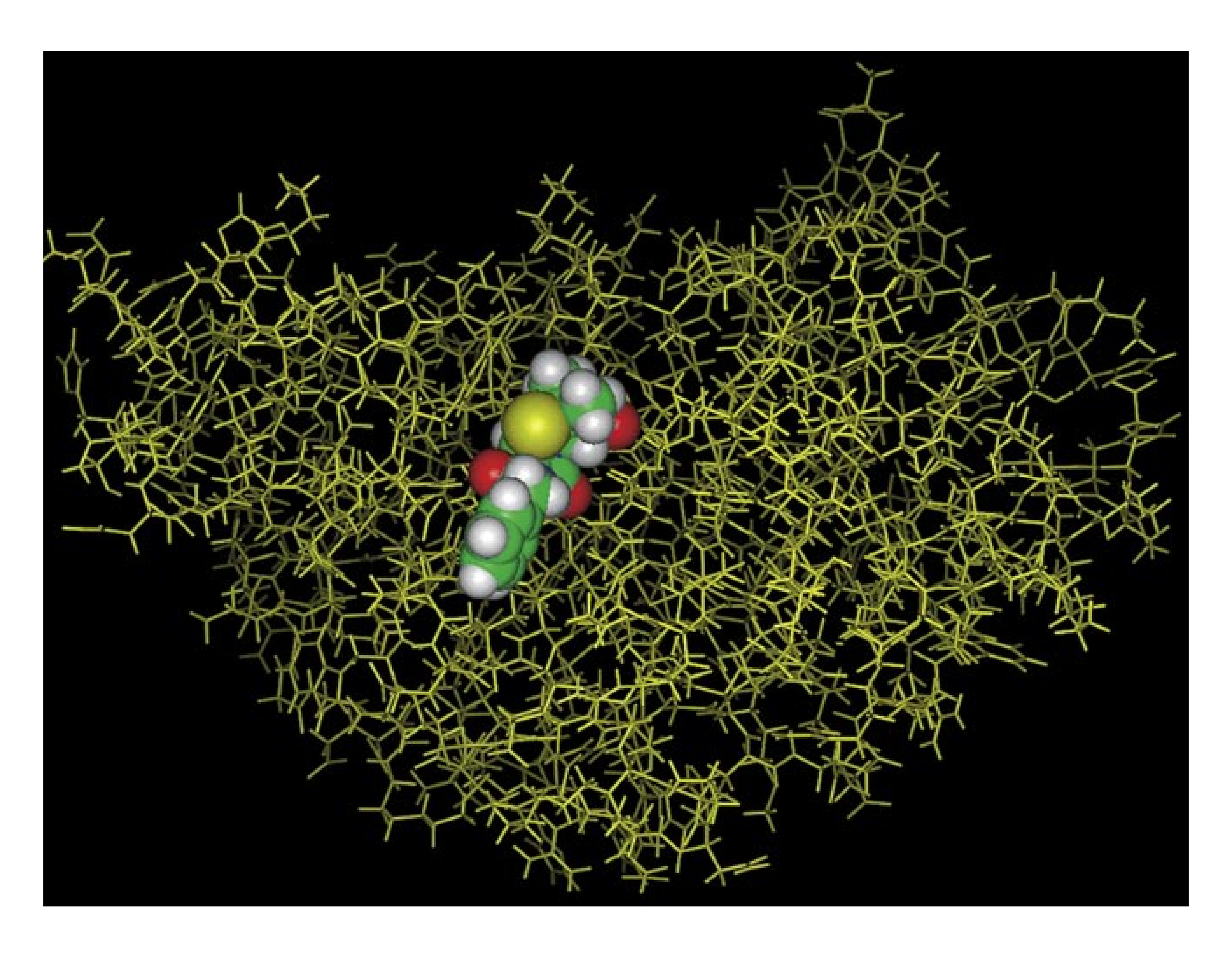
No se comprenden, sin embargo, las relaciones entre estructura y actividad. Las relaciones observadas son meramente descriptivas y no explicativas, pues se ignora cómo actúan los principios activos así creados sobre sus dianas biológicas. Aun habiendo establecido relaciones cuantitativas entre ciertas características estructurales y la actividad, en el mejor de los casos no se ha optimizado más que una de las etapas indispensables para la eficacia de los principios activos, como puede ser el engarce de una molécula en su receptor. La absorción por vía oral o subcutánea, el reparto entre los órganos tomados como diana, la transformación metabólica, las actividades indeseables, etcétera, son otros tantos parámetros suplementarios que no tienen por qué satisfacer las mismas relaciones. La consecuencia es que los principios activos optimizados suelen ser fruto de una serie de compromisos.

De moléculas endógenas se han obtenido también otros muchos principios activos: análogos de prostaglandinas (moléculas compuestas de dos cadenas de hidrocarburos injertadas en un ciclo con cinco átomos de carbono) modulan numerosas reacciones metabólicas; péptidos (cadenas de varios aminoácidos) del hipotálamo estimulan la secreción de hormonas hipofisiarias; análogos de la adrenalina, de la dopamina o de la serotonina ejercen su función en el sistema nervioso.

Los compuestos biológicamente activos que formaban cabezas de serie deben su actividad al enlace con receptores, unas proteínas. Los derivados de tales cabezas de serie ejercen a menudo una actividad biológica análoga a la de la propia cabeza (agonistas), pero las modificaciones químicas conducirán también a compuestos antagonistas, es decir, a moléculas que se oponen a la actividad de las moléculas agonistas bloqueando los receptores.

Hemos obtenido antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) sustituyendo algunos de los diez aminoácidos de esta última molécula por aminoácidos sintéticos liposolubles. Fue un golpe de suerte. En un comienzo, la corta pervivencia de los péptidos constituía un obstáculo, y nosotros solamente pretendíamos estabilizarlos en el organismo sustituyendo ciertos aminoácidos naturales por sus análogos sintéticos. Tales modificaciones engendraron agonistas más potentes y antagonistas. Asimismo, la sustitución de átomos de hidrógeno ligados al núcleo esterano por grupos obstructores, generalmente lipófilos, ha transformado en antagonistas a varios agonistas de la progesterona, la cortisona y el estradiol: el RU 486, principio activo de la píldora abortiva, es uno de los ejemplos más conocidos conseguidos por este procedimiento.

A menudo quedan sin comprenderse las modificaciones de actividad obtenidas de este modo, y se necesita una intensa labor para dilucidar los efectos observados. En el caso del RU 486, por ejemplo, sólo al cabo de muy numerosos estudios se entendió que la actividad antagonista resultaba de una conformación modificada del complejo entre el ligando y el recep-

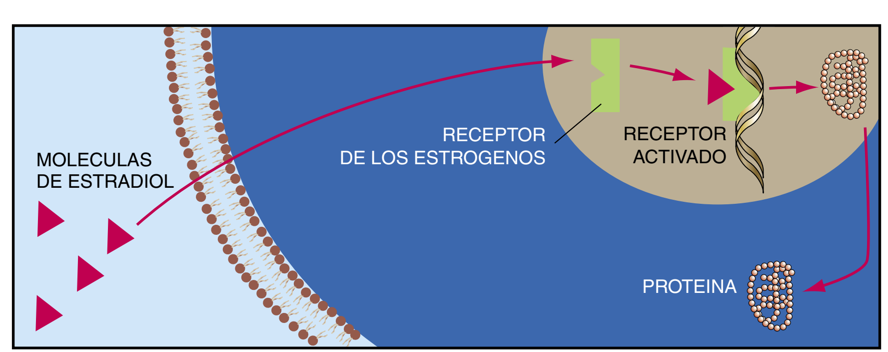


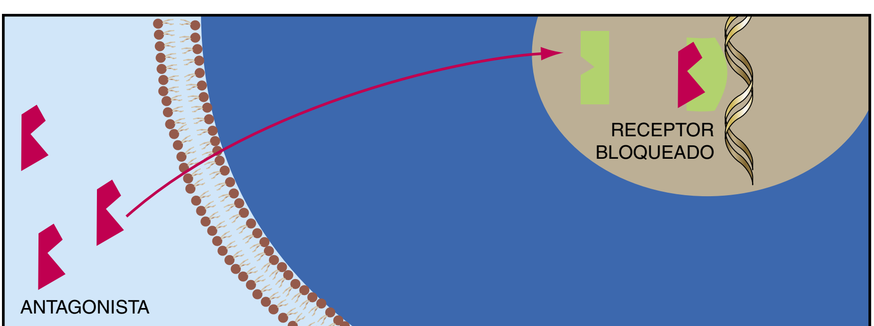
tor, que deja a este último incapaz de desencadenar la transcripción de los genes que aseguran la actividad agonista. Por otra parte, los estudios detallados del mecanismo de acción de la molécula han demostrado que los receptores de las hormonas esteroideas son suficientemente flexibles para unirse a ligandos diversos, a condición de que estén presentes ciertos elementos de reconocimiento: por ejemplo, el átomo de carbono 3 del núcleo esterano debe estar unido a un átomo de oxígeno en las hormonas esteroideas.

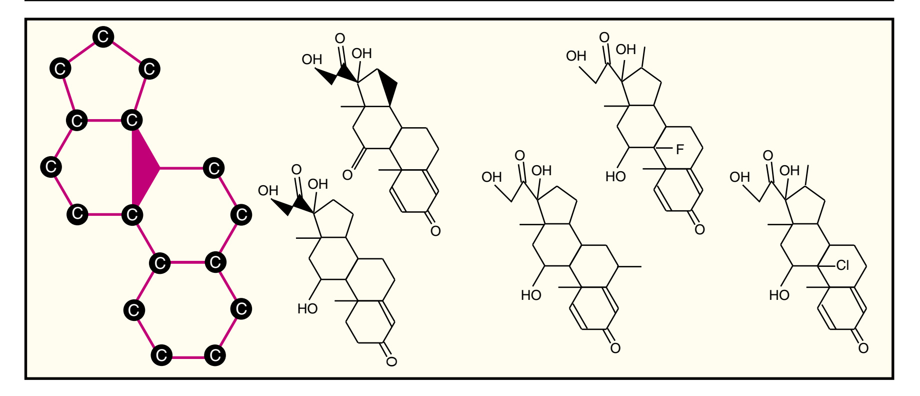
La naturaleza nos reserva sorpresas. Durante largo tiempo los químicos médicos han admitido que el carácter agonista o antagonista de una molécula para un receptor no dependía del órgano ni del tejido que contenía ese receptor. Sin embargo, el grupo de J. Compston, de la Universidad de Cambridge, demostraría que ciertas moléculas cuya fórmula química está próxima a la de los estrógenos son agonistas en unos tejidos y antagonistas en otros, sin dejar de actuar siempre sobre el mismo receptor.

Más recientemente los químicos de los laboratorios Eli Lilly han comprobado que el raloxifeno, fármaco administrado para prevenir la osteoporosis, actúa como antiestrógeno sobre el útero (evita la proliferación de células del endometrio) y sobre las células cancerosas dependientes de estrógenos (limita su crecimiento), al tiempo que conserva una actividad estrogénica sobre los receptores óseos (lo que asegura la integridad de los huesos).

Este descubrimiento de "moduladores selectivos del receptor estrógeno" es prometedor, puesto que permite concebir moléculas que tengan varias actividades simultáneas: un mismo fármaco podría preservar la masa ósea de una mujer menopáusica, rebajar su concentración de colesterol en la sangre, respetar la mucosa uterina e inhibir el desarrollo de células cancerosas sensibles a los estrógenos.







2. LA QUIMICA MEDICA lleva largo tiempo dedicada a la síntesis de derivados de los principios activos llamados cabezas de serie. Se han descubierto así moléculas que se unen a las mismas dianas que las de las cabezas de serie, sea ejerciendo la misma acción (agonista) sea provocando su efecto (antagonista). En la parte izquierda de la imagen se ha representado el modo de acción de la progesterona o de uno de sus agonistas (*arriba*) y el de un antagonista, como el RU 486 (*abajo*). A la derecha se ilustran el núcleo esterano, presente en numerosas hormonas, y varias moléculas que lo contienen: el cortisol y otras moléculas derivadas (prednisona, metilprednisolona, dexametasona y beclometasona).

La riqueza del entorno

Sobradamente exploradas ya, las moléculas endógenas tienen todavía un gran porvenir. Los neurobiólogos o los inmunólogos, por ejemplo, identifican hoy una multitud de componentes que se asemejan a las hormonas y que por ello podrían conducir a derivados biológicamente activos: podrían ser prometedoras cabezas de serie los interferones liberados cuando se producen agresiones por virus, los péptidos cerebrales, que aseguran la comunicación entre neuronas, y las citoquinas que regulan las interacciones de las células por sí mismas.

¿Por qué aferrarse a las moléculas ya presentes en el organismo? El entorno contiene una multitud de componentes activos, en cuya modificación también se empeñan los químicos médicos. Al contrario que en los trabajos con moléculas endógenas donde los conocimientos fisiológicos guían al experto, los estudios no pueden aquí apoyarse en bases previas (salvo en el caso de los medicamentos tradicionales); la investigación no puede comenzar hasta que una molécula extraída de una planta, de un hongo o una bacteria se revela, a menudo casualmente, poseedora de una actividad biológica. Una vez establecida su estructura química, el especialista acomete el mismo trabajo que para las moléculas endógenas en cuanto a síntesis de análogos y esbozo de modelización de las relaciones entre estructura y actividad.

La mayoría de los antibióticos provienen de estudios de esta índole: penicilinas, cefalosporinas, monobactamos, macrólidos, aminoglicósidos se han obtenido por hemisíntesis, es decir, por modificación química de cabezas de serie recogidas en la

naturaleza. Análogamente, del opio se han derivado morfínicos activos sobre el sistema nervioso central, mientras que se obtenían fármacos neuroactivos a partir de alcaloides del tipo de la ergotamina (compuesto presente en el cornezuelo del centeno) y, más recientemente, se han conseguido productos anticancerosos a partir del taxol (contenido en el tejo).

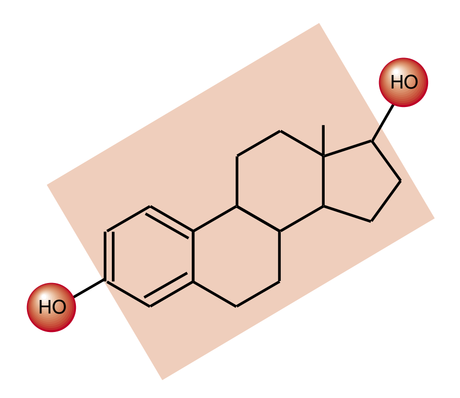
Con mayor frecuencia que en las moléculas endógenas, ya adaptadas molecularmente al organismo, el químico médico debe modificar la "biodisponibilidad" de las moléculas estudiadas; por ello se ha necesitado un gran número de ensayos para conseguir penicilinas y cefalosporinas susceptibles de absorción por vía oral y por tanto resistentes a los ácidos y las enzimas del sistema digestivo.

También aquí, el método es pragmático: el experto procede por hipótesis sucesivas, apoyándose en el conocimiento fisicoquímico de los componentes activos y de los medios en los que deben actuar. Por ejemplo, para producir penicilinas administrables por vía oral se han sintetizado precursores de las moléculas activas (prodrogas) capaces de atravesar la pared intestinal y que son escindidos, en la sangre, por enzimas esterasas: el compuesto activo se libera entonces en el torrente sanguíneo. Se quiere encontrar hoy métodos de igual eficacia para las cefalosporinas.

La mejora de los medicamentos

Si a los compuestos naturales todavía les aguarda un brillante futuro, no por ello la química médica abandona las moléculas sintéticas que pueden constituir cabezas de serie. Más aún, ésta es la actividad cotidiana de una gran mayoría de especialistas, empeñados en aumentar la actividad y la selectividad, superar los fenómenos de resistencia, disminuir los efectos secundarios o tóxicos, elaborar métodos de síntesis menos costosos... Con frecuencia el número de objetivos es tan grande, que el trabajo recuerda la cuadratura del círculo.

Está de moda la investigación de bioisósteros, esto es, funciones químicas diferentes que tienen sin embargo la misma actividad biológica. A este respecto, se sabe desde los años ochenta que el grupo tetrazol (un ciclo pentagonal de cuatro átomos de nitrógeno y un átomo de carbono, con un átomo de hidrógeno unido a uno de los átomos de nitrógeno) actuaba como las moléculas sulfonilureas $R–SO_2–NH–CON$ y los ácidos carboxílicos R–COOH: en los tres casos puede disociarse un átomo de hidrógeno del grupo (carácter ácido). Se ha observado asimismo que, en algunos raros casos, el grupo nitro $–NO_2$ puede actuar como un carboxilato –COO–.

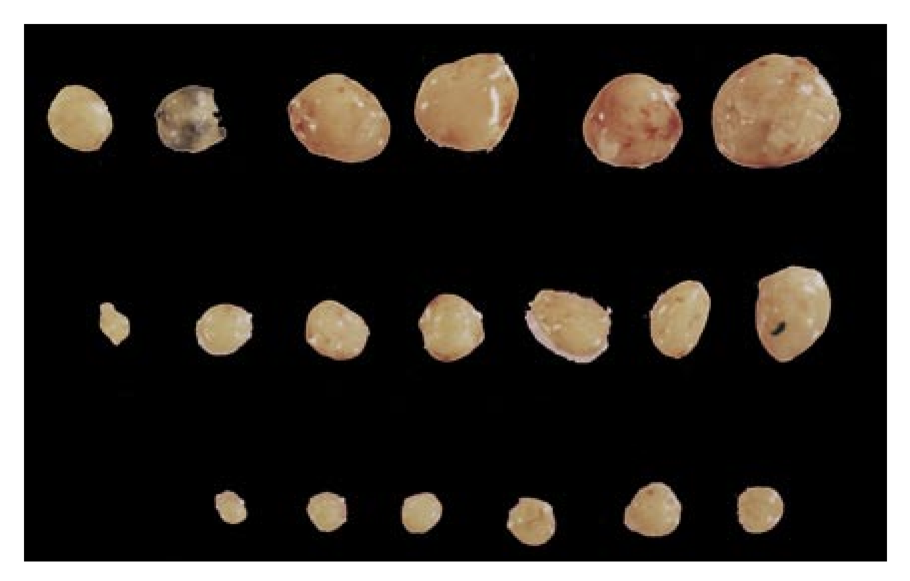


3. UN FARMACOFORO es un conjunto de grupos químicos cuya acción combinada es responsable de una actividad biológica. El farmacóforo del estradiol es aquí el conjunto de los dos grupos hidroxilo (–OH) en los extremos de la molécula. Estos grupos no actúan sobre el receptor de la hormona solamente porque se les mantiene separados a una distancia aproximada de un nanómetro. Otras moléculas que tienen esta propiedad actúan sobre el mismo receptor.

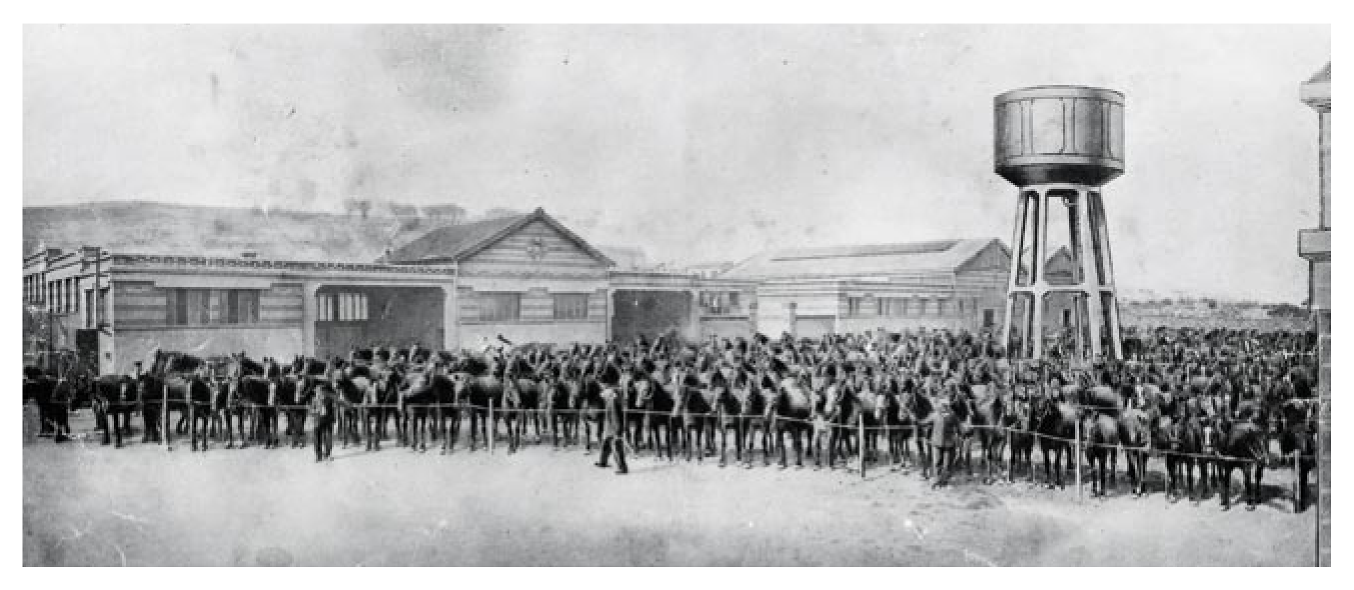
Existen otras analogías entre grupos químicos que aportan variaciones interesantes preservando las actividades de base. Así, puede a veces reemplazarse ventajosamente un átomo de oxígeno = O por un grupo difluorometilo $–CHF_2$, puesto que la densidad de electrones es elevada en los dos casos. Del mismo modo, puede sustituirse un grupo metilo $–CH_3$ por un átomo de cloro –Cl si se considera el carácter lipófilo (capacidad de disolverse en grasas).

Dos grupos químicos nunca son equivalentes, pero ahí radica el interés: sus diferencias ofrecen la posibilidad de modificar la actividad biológica. La enorme diversidad de las dianas biológicas no permite prever con fiabilidad absoluta el comportamiento de las moléculas nuevas, pero sí orientar las tentativas de modificación.

Se utiliza mucho para estos trabajos el concepto de "farmacóforo", a la vez más antiguo y más amplio que el de bioisóstero: designa la estructura necesaria para obtener una actividad biológica dada. Por lo general consiste en un conjunto de grupos químicos (casi siempre de dos a cuatro) que ocupan posiciones definidas en el espacio, bien porque estos grupos estén soportados por átomos de carbono vecinos, en las moléculas,



4. DIVERSAS MOLECULAS derivadas de los estrógenos bloquean el desarrollo de las células mamarias y permiten luchar contra el cáncer de mama. Se compara aquí el efecto del estradiol (*fila superior*), del estradiol administrado con tamoxifeno (*fila central*) y del estradiol administrado con el compuesto RU 58668 (*fila inferior*) sobre tumores mamarios de ratas: mientras que la hormona favorece el crecimiento canceroso, el tamoxifeno y, todavía más, el RU 58668 limitan o hacen remitir los tumores. La fotografía muestra el efecto de las moléculas en diversas ratas, tras diez semanas de tratamiento; los tumores aparecen clasificados por orden de tamaño.



5. LAS HORMONAS ESTEROIDEAS son sintetizadas por los organismos animales a partir del colesterol. Un ejemplo es la progesterona que, segregada por el cuerpo lúteo y la placenta, asegura la anidación del óvulo e interviene en el embarazo. Las hormonas esteroideas están presentes en la sangre y la orina, aunque en concentraciones demasiado débiles para satisfacer las necesidades terapéuticas, menos en el caso de los estrógenos equinos, que todavía se extraen de la orina de yeguas preñadas (arriba, la cuadra de los Laboratorios Roussel en Romainville, en los años treinta).

o bien porque haya grupos alejados a distancias fijas. Este concepto ha evolucionado con la aparición de los bancos de datos informatizados de estructuras tridimensionales de moléculas: en su origen el farmacóforo correspondía a una molécula real o al menos a una estructura parcial, mientras que hoy designa una combinación de grupos desglosada.

Uno de los farmacóforos más sencillos que hemos estudiado es el de los estrógenos, una clase de hormonas cuya cabeza de fila es el estradiol, la hormona feminizante de los mamíferos. Este farmacóforo está constituido por dos donadores de enlaces hidrógeno (grupos hidroxilo –OH) separados aproximadamente a un nanómetro por una estructura hidrófoba (el núcleo esterano). Corresponde a esta definición una multitud de moléculas capaces de unirse al mismo receptor. Esta “amplitud” del farmacóforo de los estrógenos es la que explica que numerosas moléculas del entorno o de las plantas tengan una actividad análoga a la actividad de las hormonas humanas (xenoestrógenos y fitoestrógenos, respectivamente).

En este caso concreto, lo que es una ayuda para el químico médico se convierte en un inconveniente para las mujeres: es sabido que los estrógenos administrados en dosis excesivas pueden desarrollar cánceres de mama, y los oncólogos han establecido que una proporción notable de este tipo de cánceres son debidos a dichos xenoestrógenos y fitoestrógenos; por el contrario, parece ser que determinados fitoestrógenos presentes en los alimentos (soja) protegen a las mujeres japonesas.

La parte hidrófoba situada entre los dos grupos hidrófilos es importante, puesto que, según sea su constitución exacta, modifica la actividad global de la molécula. A veces hasta participa directamente en el enlace en el receptor. Adviértase además que un mismo farmacóforo puede tener varias actividades diferentes. Por ejemplo, el RU 486 es un antiglucocorticoide, es decir, un oponente a la actividad del cortisol, mas también es un antiprogesterona y, por tanto, puede fijarse sobre varios receptores.

Enfoque mecanicista

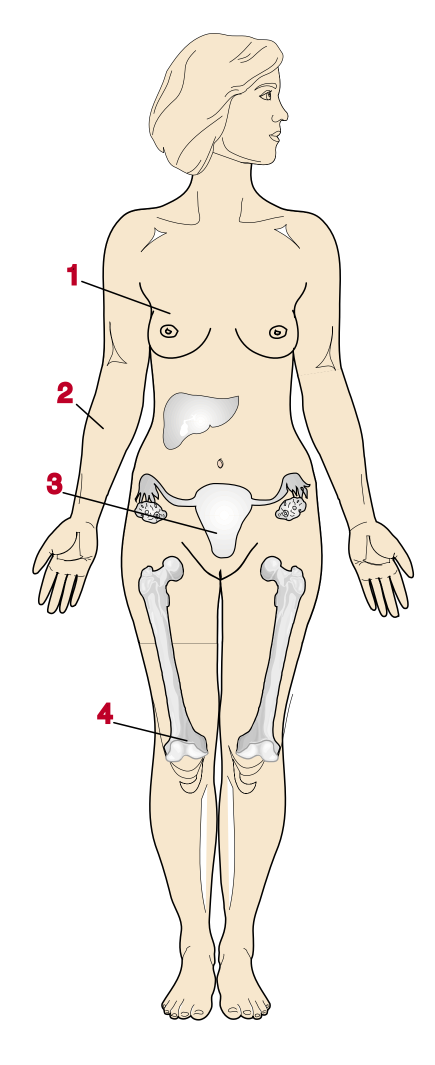
Si bien el químico a menudo tiene que tantear para encontrar moléculas que se unan a un receptor cuya estructura todavía se desconoce, es posible seguir un método más racional en la búsqueda de inhibidores de enzimas. En este caso particular —aunque importante, si pensamos en las antiproteasas utilizadas en la triterapia del sida—, dos líneas de trabajo han sentado las bases de un método racional de obtención de los principios activos. Ante todo, los bioquímicos han aprendido a cristalizar las proteínas (y las enzimas, que son proteínas), de modo que por cristalografía se ha podido determinar su estructura. Por otra parte, los estudios más clásicos de bioquímica han aportado un buen conocimiento de las reacciones enzimáticas.

Para inhibir las enzimas, se puede primeramente administrar en gran cantidad una molécula análoga al substrato de la enzima, con lo que ésta transforma ese substrato exógeno en vez de actuar sobre el substrato endógeno. Puede también administrarse un substrato exógeno que ella sea incapaz de escindir, denominado inhibidor competitivo. En tal caso, la afinidad del análogo del substrato por el sitio activo de la enzima es lo que determina que la enzima se una al inhibidor antes que al substrato natural.

En el caso de las enzimas que contienen un átomo de metal (zinc o hierro), son particularmente eficaces los inhibidores quelatantes, que forman complejo con el átomo metálico. Se puede también apuntar, no al substrato aislado, sino al substrato en proceso de transformación, con el fin de obtener un efecto mejor dirigido, dada la forma muy particular que toma el substrato unido a la enzima.

Los inhibidores suicidas parecían ofrecer grandes promesas: son moléculas que al ser modificadas por las enzimas liberan una parte que desactiva la enzima, con lo que ésta sucumbe a una especie de accidente de trabajo. Pese a la elegancia de la operación, ya no se investiga más sobre este tipo de inhibidor, porque se forman entonces intermediarios

6. LOS MODULADORES selectivos de receptores son, sin duda, los medicamentos del futuro, puesto que ejercen simultáneamente diversos efectos sobre el organismo. Los más avanzados son los del receptor de los estrógenos, sometidos ahora a ensayo para prevenir la osteoporosis: conservan las propiedades beneficiosas de los estrógenos sobre el mantenimiento de la masa ósea (4) y el descenso de colesterol (2), al tiempo que desarrollan una actividad antiestrogénica sobre el útero (3) y sobre células cancerosas sensibles a los estrógenos (1).



reactivos que pueden escaparse y actuar sobre otras moléculas que no son enzimas. Además, la destrucción de las enzimas suele provocar una reacción del organismo que, al detectar una reducción de la concentración de enzimas, activa sus sistemas de renovación de la molécula.

El enfoque estructural

El principal avance reciente es fruto de la constitución de bancos de datos de estructuras tridimensionales de proteínas diana (receptores, enzimas), eventualmente complejas en su ligando (receptores) o en un inhibidor (enzimas).

La ingeniería genética, ya muy desarrollada, ha contribuido al rápido enriquecimiento de estos bancos de datos: es posible sintetizar proteínas a medida por manipulación de genes a partir de secuencias genéticas identificadas. La estructura de las moléculas sintetizadas se obtiene después por métodos de cristalografía de las proteínas.

Estas informaciones revolucionan la química médica; antes el experto obtenía trabajosamente una idea, a menudo imprecisa, del sitio activo, tratando de establecer indirectamente la topografía mediante la síntesis de un gran número de ligandos, mientras que hoy, cada vez más, se encuentra frente a un modelo realista de la diana. Es como si alguien encendiera la luz en el castillo de la Bella Durmiente, hasta ahora sumido en la oscuridad.

Así es como la preparación de potentes inhibidores de la proteasa del VIH, con los que se trata hoy a los enfermos del sida, se ha apoyado en gran medida en las estructuras obtenidas por rayos X de la enzima, una vez convertida en complejo por los inhibidores detectados inicialmente por cribado molecular. Este procedimiento de cocristalización se ha utilizado, incluso con frecuencia, de un modo iterativo en el proceso de optimización de las moléculas. Ello permite mejorar con rapidez la afinidad del inhibidor (o del ligando) por el sitio activo (o el receptor), optimizando con conocimiento de causa las interacciones ligantes o reduciendo al mínimo las interacciones desfavorables gracias a la modelización y los cálculos de energía.

Se ha llegado hasta diseñar *de novo* ligandos de enzimas partiendo del simple conocimiento del sitio receptor. No hay duda de que este método se desarrollará con rapidez, tanto más cuanto que los programas de cartografía del genoma humano anuncian una explosión del número de proteínas diana. El diseño de los principios activos no se convertirá, sin embargo, en una operación banal; siempre habrá que resolver *in vivo* los problemas de farmacodinámica y de actividad, para los que no hay solución general. Puede, no obstante, esperarse que la utilización intensa del banco de datos informáticos será un valioso auxilio para encontrar soluciones por analogía.

Se comprende, pues, que la informática sea uno de los factores decisivos en el progreso fulgurante de la química médica. Permite utilizar de un modo interactivo la modelización molecular y la determinación estructural por rayos X, reduciendo considerablemente los tiempos de cálculo, pero también cribar con rapidez los bancos de estructuras tridimensionales en busca de farmacóforos potenciales. La aparición de la química combinatoria y los cribados biológicos de alto rendimiento conduce a un aluvión de datos que no podrían aprovecharse de no ser por medios informáticos.

En ausencia de datos estructurales tridimensionales sobre una proteína, a menudo es posible modelizarla a partir de la estructura de una proteína afín. La constitución de bibliotecas virtuales de productos con ayuda de programas informáticos, técnica que se ha denominado síntesis *in silicio*, permite evaluar un gran número de moléculas potenciales, de farmacóforos, de conformaciones o de características calculables *a priori*. Merced a estos ejercicios de simulación, se reducirá progresivamente la dosis de incertidumbre y de tanteos de la química médica, convirtiendo en verdadera ciencia lo que antes era un arte.

Nunca ha estado tan próximo a realizarse el sueño de la industria farmacéutica: poder programar la puesta a punto de nuevos medicamentos; afirmamos sin embargo que restan suficientes incógnitas como para dejar a los químicos médicos campo abierto donde ejercitar su perspicacia y su creatividad.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

MEDICAL CHEMISTRY OF TETRAZOLE. H. Singh, A. Chawla, V. Kapoor, D. Paul, R. Malhotra, bajo la dirección de G. Ellis y G. West, Elsevier, en *Progress in Medicinal Chemistry*, págs. 151-183, 1980.

EFFECT OF LONG TERM TAMOXIFEN TREATMENT ON BONE TURNOVER IN WOMEN WITH BREAST CANCER. C. Wright, E. Mansell, J.-C. Gazet y J. Compston, en *British Medical Journal*, vol. 306, págs. 429-430, 1993.

THE PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY. Camille Georges Wermuth, Academic Press, 1996.

La síntesis combinatoria

La química combinatoria nos ofrece en un tiempo muy breve las diferentes configuraciones en que puede aparecer un conjunto de moléculas

Daniel Michelet y Claude Hélène

Los farmacólogos se afanan en una búsqueda incesante de nuevos medicamentos. Pero su estrategia investigadora ha ido evolucionando en el curso del tiempo, adoptando métodos que acostumbran ser complementarios: investigación sistemática de actividad biológica entre las moléculas sintetizadas en un laboratorio, selección de sustancias naturales o proyecto molecular asistido por ordenador. Hoy, la química combinatoria permite crear colecciones, o bancos, de moléculas por combinación de un juego básico de ellas. Al operar así, los químicos imitan a la naturaleza, que, partiendo de un puñado de moléculas elementales, ha construido genes y proteínas en toda su diversidad.

A lo largo de los años setenta, los progresos registrados en el campo de la ingeniería genética posibilitaron que los biólogos prepararan cantidades notables de proteínas puras. Con ese fin, se introduce el gen codificante de la proteína investigada en el genoma de una bacteria; el microorganismo sintetiza entonces esta molécula como si se tratara de una de sus propias proteínas. Las hay que, como la insulina o los factores de crecimiento, son medicamentos. Otras son dianas terapéuticas: inhibiendo, parcial o totalmente, su actividad biológica, podemos domeñar los mecanismos biológicos en que intervienen.

DANIEL MICHELET y CLAUDE HELENE sienten un mismo interés por la química combinatoria. Michelet estuvo integrado, de 1992 a 1997, en la dirección científica del grupo Rhône-Poulenc. Hélène comparte su trabajo en dicha empresa con la dirección de un laboratorio de la red estatal francesa de investigación.

Los bioquímicos pusieron a punto tests colorimétricos que les permitían evaluar la afinidad de una molécula por una proteína diana y seleccionar sólo moléculas que presentan interés farmacológico en potencia. Estos tests “criban” decenas de miles de moléculas al mes, privilegio del que no gozaron los laboratorios que las habían elaborado.

En el decenio siguiente, el de los ochenta, los inmunoquímicos se esforzaban ya por establecer la estructura de los fragmentos de las proteínas víricas (o péptidos víricos) que desencadenaban las reacciones del sistema inmunitario de un organismo infectado por un virus. Para sintetizar numerosos péptidos de 5 a 12 aminoácidos, habían puesto a punto el nuevo método de la síntesis en paralelo. Merced a los péptidos producidos por estas síntesis en paralelo, los inmunólogos identificaron numerosos sitios de unión entre los anticuerpos y las proteínas víricas.

El método combinatorio, aunque procede de la síntesis de péptidos en paralelo, se revela más potente: produce un número de moléculas que crece exponencialmente en cada etapa de la síntesis (por contra, en la síntesis en paralelo se obtiene un número constante de péptidos en cada etapa). Se trata de un modo de síntesis divergente.

De la síntesis a la identificación

Si en vez de introducir un aminoácido en cada estadio de la síntesis, instamos que reaccionen simultáneamente los 20 aminoácidos naturales, se obtienen en n etapas 20^n péptidos, que representan todas las combinaciones posibles de los 20 aminoácidos en moléculas ordenadas de n elementos. En la práctica, el método de síntesis en paralelo divergente no da la diversidad molecular esperada, porque los aminoácidos beligerantes no reaccionan con la misma velocidad; en consecuencia, muchos péptidos escasearán, si es que no faltan del todo. Se han preparado otros métodos que dan efectivamente cantidades equivalentes de todas las combinaciones posibles de péptidos: el método de síntesis por repartición y mezcla y la síntesis controlada por la luz.

En el método por repartición y mezcla, la síntesis acontece sobre un soporte sólido constituido por microsferas o perlas de poliestireno. Situadas en un disolvente se hinchan y el interior se hace accesible a los reactivos disueltos. Cada microsfera porta unos 10^{13} amarres que interaccionan con los reactivos. Por reacciones sucesivas, se obtienen oligómeros, moléculas constituidas por el encadenamiento de múltiples subunidades. Cuando las moléculas componentes son aminoácidos, hablamos de oligopéptidos.

Si se dispone de n moléculas de construcción y se realizan p etapas de condensación, se producen n^p moléculas; cada perla, sin embargo, contiene un solo tipo de moléculas (de las que porta unas 10^{13} copias).

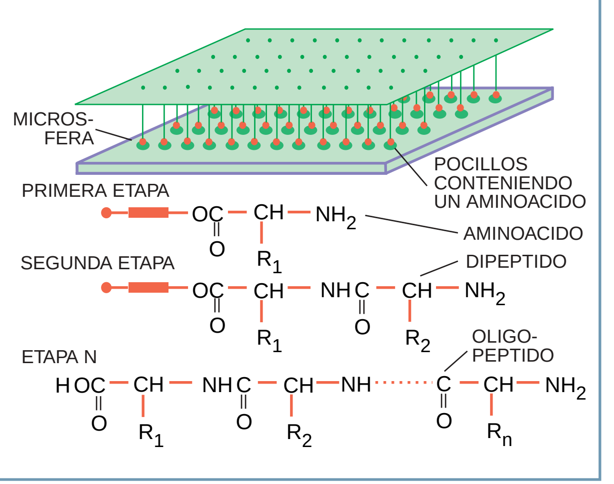
¿Cómo se identifican las microsferas que llevan las moléculas activas? Al final de la reacción, se distribuyen las perlas en “pocillos” huecos de una placa y se libera una parte de los péptidos que portan. Estas moléculas se solubilizan entonces en el líquido de los pocillos y se someten al test colorimétrico, que revela la afinidad de una de las moléculas sintetizadas por una proteína diana. Si uno de los pocillos se colorea, significa que una microsfera porta una molécula de interés. Las perlas de este pocillo se distribuyen sobre una nueva placa y se vuelve a empezar el test

La síntesis en paralelo

En la síntesis en paralelo, una perla o microsfera de poliestireno se fija a una varilla de polietileno. Cada pocillo de la placa aloja un aminoácido.

La perla pegada a la varilla se sumerge en los pocillos y el aminoácido presente en cada pocillo se ancla, a través de un brazo, en la microsfera sumergida. Después se cambian los aminoácidos contenidos en los pocillos y se sumergen de nuevo las perlas. El nuevo aminoácido se une al primero, formando un dipéptido. Después de *n* etapas, se obtiene un polipéptido que se libera en los pocillos cortando el eslabón que ligaba a la microsfera de poliestireno.

Por este método se obtienen tantos péptidos diferentes cuantos pocillos hay. Estas moléculas se forman por aminoácidos que sucesivamente se han introducido en los pocillos.



Los diferentes métodos de síntesis de bancos combinatorios

La síntesis en paralelo divergente

MOLECULA A_1
MOLECULA A_2
MOLECULA A_3
MICROSFERA DE POLIESTIRENO

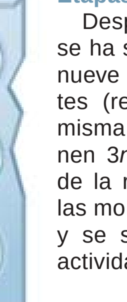
Etapa 1

Se dispone de un juego de tres moléculas A_1, A_2, A_3. Estas moléculas se fijan en diferentes microsferas de poliestireno.



Etapa 2

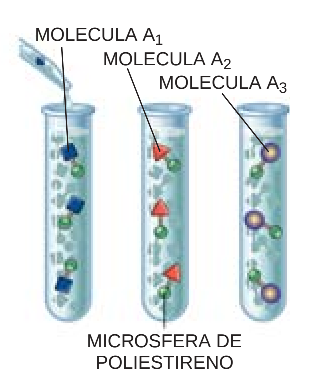
Se añade en cada uno de los pocillos la mezcla de las tres moléculas A_1, A_2, A_3. Se obtienen las moléculas A_1A_1, A_1A_2, A_1A_3, A_2A_1, A_2A_2, A_2A_3, A_3A_1, A_3A_2, A_3A_3 (para simplificar, no se ha representado más que un tipo de moléculas por pocillo, pero en realidad los tres tipos de moléculas son mezclas sobre cada línea).



Etapas sucesivas

Después de dos etapas, se ha sintetizado 32, o sea, nueve moléculas diferentes (repitiendo *n* veces la misma operación se obtienen 3*n* moléculas). Al final de la reacción, se separan las moléculas de su soporte y se somete a prueba su actividad biológica.

La síntesis por repartición y mezcla



Etapa 1

Se colocan las microsferas de poliestireno en los tubos de ensayo. Se añade una molécula por tubo (las cuadradas); las moléculas A_1 en el primer tubo, las moléculas A_2 en el segundo, etc. Sólo se han representado tres tubos, pero pueden utilizarse decenas.

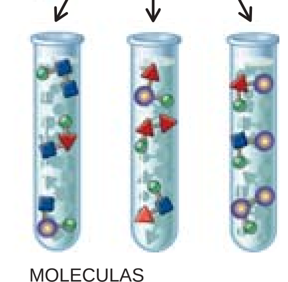


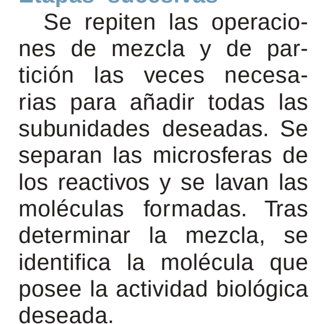
Etapa 2

Se filtra el contenido de los tubos, se lavan, se reagrupan todas las microsferas y se mezclan.

Etapa 3

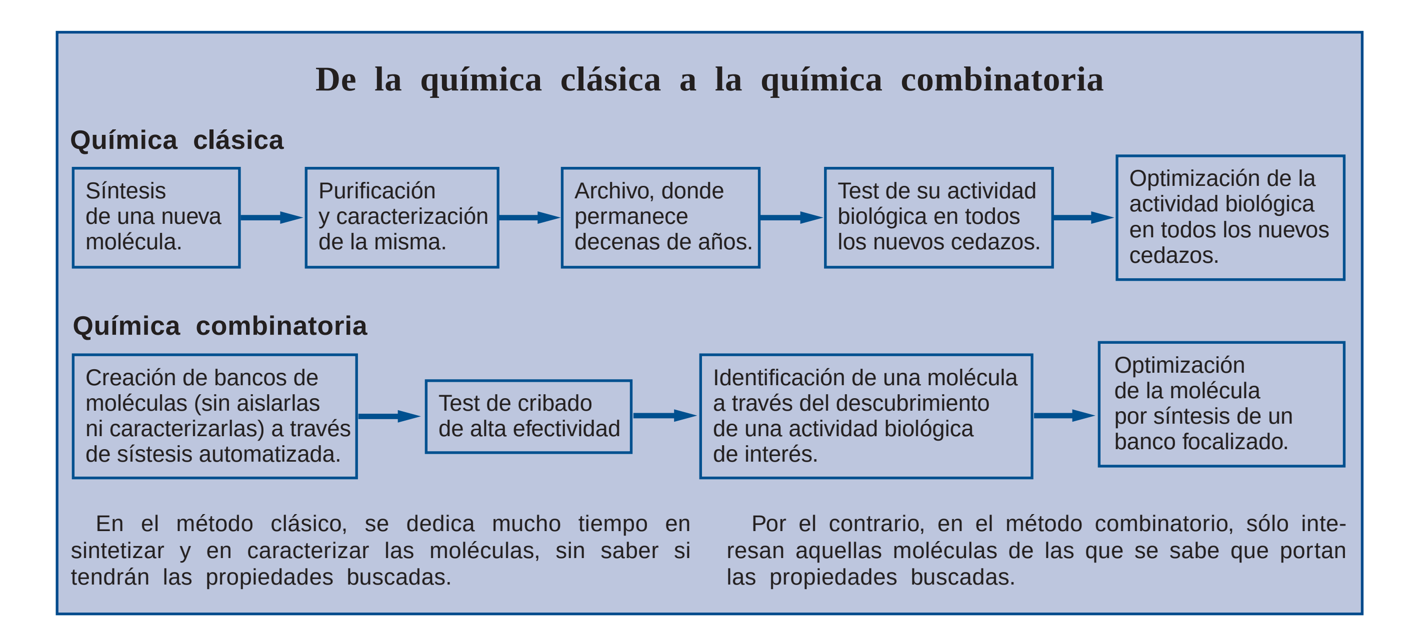
Se reparte la mezcla en tres y se les añaden nuevas moléculas A_1 en el tubo 1, moléculas A_2 en el tubo 2, etc.





Etapas sucesivas

Se repiten las operaciones de mezcla y de partición las veces necesarias para añadir todas las subunidades deseadas. Se separan las microsferas de los reactivos y se lavan las moléculas formadas. Tras determinar la mezcla, se identifica la molécula que posee la actividad biológica deseada.



colorimétrico; se descubre así qué pocillo contiene la molécula activa. Se la puede entonces caracterizar por métodos físico-químicos.

El segundo método, de síntesis dirigida por la luz, se desarrolla igualmente sobre soporte sólido, sobre un plano. Los aminoácidos colocados sobre la superficie plana portan un grupo protector sensible a la luz que les impide reaccionar. La luz ataca a los grupos protectores, de suerte que sólo los péptidos situados en las zonas iluminadas se unen al aminoácido presente en la disolución donde está sumergido el plano. Con técnicas propias de enmascaramiento de la fotolitografía, se sintetizan 2^n péptidos con n máscaras en n etapas. La empresa californiana Affymax, que ha puesto a punto este método, ha obtenido 2^{16} (es decir 65.536) péptidos diferentes sobre una superficie de menos de dos centímetros cuadrados.

Sabremos dónde están los péptidos de interés potencial cuando detectemos los que se unen a la diana biológica deseada, gracias, por ejemplo, a los anticuerpos fluorescentes. Puesto que se conoce la secuencia de aminoácidos que se han añadido y se ha registrado la posición de las máscaras, podemos inferir la composición de los péptidos por su posición sobre el plano.

Moléculas de la síntesis combinatoria

La química combinatoria ha servido, ante todo, para la síntesis de péptidos a partir de aminoácidos naturales. Por el mismo procedimiento se han preparado bancos de péptidos a partir de aminoácidos artificiales, de los que se esperaba que resistieran la acción de las proteasas, enzimas que degradan las proteínas. Así se han obtenido pseudopéptidos, o peptoides. Los químicos han preparado igualmente bancos combinatorios de oligonucleótidos (fragmentos de ADN). Se sintetiza una mezcla de oligonucleótidos, moléculas que se componen de dos secuencias fijas (con los extremos formados por unos quince nucleótidos) y de una secuencia central aleatoria de n nucleótidos. Para tal síntesis se utilizan los cuatro nucleótidos naturales (constituyentes del ADN); la mezcla tendrá, por tanto, 4^n moléculas.

Contamos con varias técnicas para aislar de esta mezcla las moléculas que se fijan a una diana escogida. Se las multiplica luego por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), que ha desempeñado un papel decisivo en la selección e identificación de oligonucleótidos que reconocen una diana biológica determinada. El ciclo de aislamiento y multiplicación se reinicia una y otra vez antes de secuenciar las moléculas que interesan. Ese procedimiento se ha seguido para seleccionar oligonucleótidos cortos que inhiben la trombina, enzima de la vía de la coagulación sanguínea. En el organismo, sin embargo, esta enzima no se fija sobre ácidos nucleicos.

Los oligonucleótidos se pliegan y forman "cajas" que recuerdan los puntos activos de las enzimas. Las moléculas diana se alojan de manera muy específica: por ejemplo, un oligonucleótido seleccionado para fijar la teofilina (la principal sustancia estimulante de las hojas de té) reconoce 10.000 veces peor la cafeína, que sólo difiere de la teofilina en un grupo metilo (CH_3).

En todos los casos mencionados, la diversidad molecular se ha obtenido por la síntesis de todas las combinaciones posibles de elementos de construcción bifuncionales (que presentan una función ácida y una función amino en el caso de los péptidos, y dos funciones alcohol enlazadas por grupos fosfatos en los oligonucleótidos) en un oligómero lineal. Otra forma de crear bancos de moléculas de interés consiste en diseñar un "clasificador de funciones químicas" por los métodos combinatorios.

Consideremos, por ejemplo, un ciclo que contiene tres grupos –COOH, protegidos por grupos P que les impiden reaccionar. Se les puede eliminar selectivamente, uno a uno, sin tocar a los demás. Cuando se desecha uno de estos grupos protectores, podrá reaccionar el primer grupo –COOH y combinarse con 20 aminas diferentes: resultan 20 amidas $–CO–NHR_n$, donde n toma valores de 1 a 20. Eliminando a continuación los otros dos grupos protectores, se obtienen 8000 (20^3) triamidas (moléculas que contienen 3 funciones amida –CO–NH–). Sabiendo que cerca de 5000 ácidos y más de 3000 aminas están comercializados, y que se le puede aumentar el número de funciones contenidas en los ciclos, se entiende la diversidad de moléculas así obtenidas. Además de su diversidad, estas moléculas asteriformes son mejores productos

farmacéuticos que los péptidos o los oligonucleótidos; ofrecen una mejor biodisponibilidad (su concentración en los órganos diana en donde actúan es superior a la de los péptidos, porque pasan más inadvertidas a las enzimas proteasas).

Los expertos sueñan con crear, por química combinatoria, bancos de moléculas basados sobre el establecimiento de uniones carbono-carbono, y no solamente sobre uniones amida (–CO–NH–). Se han sintetizado ya bancos combinatorios de péptidos y de oligonucleótidos, pues se dominan tan bien los ensamblajes entre los elementos constitutivos, que se han logrado síntesis multietapas sobre soporte sólido sin tener que purificar los productos intermedios. Los productos obtenidos al final de la reacción se emplean incluso sin pasar antes por su purificación y caracterización.

La naturaleza unívoca de estas síntesis ha permitido abstraerse de lo que constituye la almendra del trabajo del químico: la purificación, el aislamiento y la caracterización, operaciones artesanales que deben acometerse molécula a molécula. Esta economía de operaciones tediosas confiere a la química combinatoria su potencia reconocida. La síntesis se reduce a operaciones de mezcla y agitación, abordables en paralelo y a gran escala por robots. Sin embargo, no se podrán crear bancos combinatorios fundados sobre otras reacciones y, en particular, sobre la creación de uniones carbono-carbono, a no ser que las reacciones sean selectivas y, satisfactorios, los rendimientos.

La generalización de la síntesis combinatoria plantea, por último, problemas de química a los químicos: encontrar condiciones de síntesis tales que el rendimiento supere el 95 %, cualesquiera que sean los sustituyentes aportados por los ladrillos elementales que reaccionan.

¿Soporte sólido o disolución homogénea?

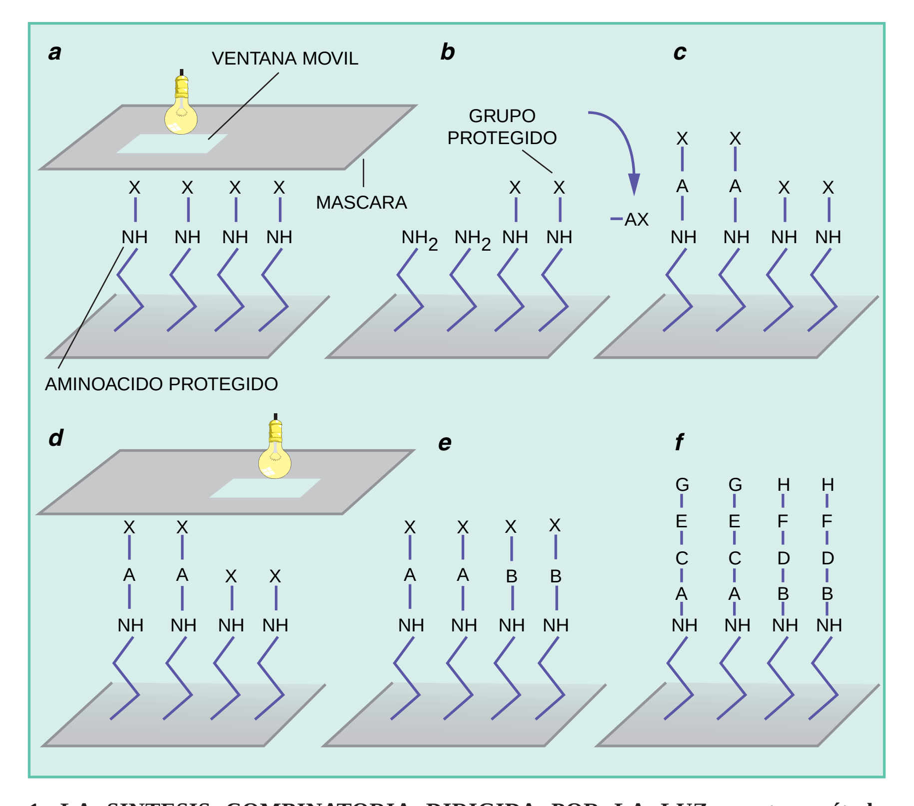
En la síntesis sobre soporte sólido, una perla porta la molécula implicada, lo que facilita separarla por filtración. En el caso de los péptidos y de los oligonucleótidos, 20 años de optimización de la síntesis sobre soporte sólido han precedido a la aparición de la química combinatoria. Con ello queremos decir que tenemos en nuestras manos un arsenal de reactivos y condiciones de elaboración para realizar síntesis sobre soporte sólido cuantitativas, cualquiera que sea la secuencia a hilvanar. Amén de péptidos u oligonucleótidos, los químicos se aprestan para obtener sobre soporte sólido síntesis que hasta ahora se venían realizando en disolución. No es fácil ese tránsito.

¿Dónde surgen las dificultades? Aun cuando las perlas de poliestireno débilmente reticuladas se hinchen en el disolvente para formar una especie de gel, lo que permite a los reactivos encontrar las moléculas fijadas al poliestireno, el medio no es idéntico a una disolución; los rendimientos son, también, inferiores.

Pero se ha progresado. Los químicos han modificado las microsferas de poliestireno engarzándoles cadenas de polietilenglicol, que las hace compatibles con un mayor número de disolventes. Habrán de suministrar, sin duda, un soporte sólido mejor adaptado, permitiendo transportar más fácilmente sobre dicha matriz las síntesis conocidas en disolución homogénea.

Otra opción consiste en esquivar el soporte sólido. Hablamos de soportes en solubilidad condicional: el primer elemento de la molécula a sintetizar se une al extremo de una molécula de polietilenglicol, gracias a un brazo flexible. El polietilenglicol es soluble en la mayoría de los disolventes; se puede así realizar la primera etapa de la síntesis en el disolvente de la reacción tradicional. En cambio, el polietilenglicol es casi insoluble en el éter. Se le hace precipitar con la molécula que lleva, añadiendo el éter y, después de filtrar, se procede de la misma manera para las otras etapas de la síntesis.

Otro método consiste en provocar reacciones de multicomponentes. Obvian también éstas la síntesis sobre soporte sólido. Muchas moléculas entran simultáneamente en reacción para rendir una sola molécula. El conjunto de las combinaciones posibles a partir de las moléculas de partida, o "sintones", representa una diversidad molecular notable. Sin embargo, se conocen pocas reacciones de este tipo; tampoco abundan las



1. LA SINTESIS COMBINATORIA DIRIGIDA POR LA LUZ es otro método destinado a la preparación de bancos combinatorios. En una primera etapa (*a*), los péptidos injertados sobre un soporte de silicio quedan protegidos por un grupo X. Se abre una ranura; la luz que penetra por ella libera los grupos protectores (*b*). Se añade ahora el ladrillo de construcción AX que sólo reacciona con los grupos sin proteger (*c*). Se desplaza la ventana (*d*) y se le añade el reactivo BX. Reaccionan sólo ciertas cadenas: aquellas cuya posición se conoce (*e*). Se van fabricando péptidos cuya secuencia y posición sobre la placa el ordenador ha registrado (*f*).

2. **SINTESIS DE ENLACES CARBONO-CARBONO por el método combinatorio. Las reacciones esquematizadas han servido para crear bancos de moléculas. Mezclando reactivos cuidadosamente escogidos, se obtiene una molécula que contiene varios sustituyentes R_n. Gracias a la síntesis combinatoria, se pueden hacer todas las combinaciones posibles a partir de diversos ácidos, aminas, cetonas, etc.**

estructuras que sean fruto de reacciones de multicomponentes. Dado su potencial en síntesis combinatoria, los químicos investigan nuevas reacciones de este tipo.

La biosíntesis por microorganismos modificados mediante técnicas de ingeniería genética crea bancos de secuencias aleatorias de péptidos. Basta con fusionar una secuencia aleatoria de nucleótidos con el gen codificante de una proteína de superficie de un bacteriófago, un virus de las bacterias. Sirviéndose de fagos, se introduce una secuencia aleatoria de nucleótidos y se levanta así un banco de fagos recombinantes: cada uno presenta en su superficie un péptido correspondiente al oligonucleótido sintético incluido en su genoma. Desde 1990, se han forjado de acuerdo con este procedimiento bancos de 10 a 100 millones de péptidos. Luego, tales archivos de péptidos presentados por fagos se han sometido a la criba de diversos receptores y se ha comprobado que muchos péptidos presentan una afinidad notable por estos receptores.

Numerosos antibióticos (los macrólidos) son moléculas cíclicas (macrolactonas) elaboradas a partir de diferentes ácidos por enzimas bacterianas. La síntesis química total es difícil y se recurre a las bacterias para biosintetizar los macrólidos; se obtienen distintas clases según la naturaleza y el orden en que se han incorporado los ácidos. Diferentes genes bacterianos, reagrupados en módulos, codifican las enzimas necesarias para la incorporación de los ácidos en el macrólido en vías de construcción. Si se dispone de n módulos y se biosintetizan macrólidos que contienen p ácidos, el clonaje de todas las combinaciones posibles de módulos conduce a p^n productos diferentes. Se trata de una evolución artificial donde todas las combinaciones se realizan aceleradamente.

Bancos restringidos y eficaces

A principio de los años noventa, se crearon bancos de péptidos de varios millones de moléculas. Estos bancos los integraban mezclas donde resultaba difícil identificar moléculas activas: varias moléculas de estructura afín y poco activas agregaban algunas veces sus efectos para dar la ilusión de que se tenía una molécula más activa. El análisis de grandes bancos se hacía tedioso. Ahora los bancos no contienen más que de 1000 a 10.000 moléculas como máximo; en la mayoría de los casos se trata de moléculas aisladas o de mezclas de un pequeño número de moléculas (entre 10 y 100), sintetizadas en paralelo.

Aunque se ha reducido la magnitud de los bancos, no se ha escatimado en diversidad molecular. Se sigue seleccionando cuidadosamente las moléculas que intervienen en la síntesis de los bancos. Los programas toman en consideración los parámetros fisicoquímicos y topológicos que optimizan la diversidad molecular, eligiendo a las mejores moléculas de construcción. Cuando ante un químico se presenta una estructura esencial para la actividad buscada, puede crear por procedimientos combinatorios un banco de moléculas que porten todas las subestructuras deseadas. Diremos que ha creado un banco de moléculas focalizado.

La búsqueda de moléculas activas para la farmacia está en el origen de la química combinatoria. Varias moléculas nacidas en esa nueva cuna están ya en curso de ensayos clínicos. Su empleo se generalizará en los próximos años. Se estima en 10^{200} el número de moléculas cuya masa molecular es comparable con la que presentan los medicamentos en uso.

La agroquímica, cuyas dianas biológicas son de la misma naturaleza que las farmacéuticas, va verosímilmente a producir sus próximas moléculas por química combinatoria.

¿Trasciende acaso el campo de aplicación de la química combinatoria el dominio de las ciencias de la vida? Sí, y Peter Schultz, de la Universidad de Berkeley, ha aplicado el método combinatorio a la síntesis de óxidos mixtos, es decir, a la química mineral. Ha realizado un banco combinatorio de películas de óxidos y ha buscado, en este banco, los compuestos que serían superconductores magnetorresistentes o que serían catalizadores. Por ese camino se ha descubierto una nueva familia de materiales de fórmula general $La_x(Ba, Sr,Ca)_yCoO_5$, que presenta una magnetorresistencia elevada.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

SYNTHESIS AND APPLICATIONS OF SMALL-MOLECULES LIBRARIES. L. Thomson y J. Ellman, en *Chemistry Reviews*, vol. 96, n.º 1, págs. 555-600, enero 1996.

COMBINATORIAL SYNTHESIS OF SMALL ORGANIC MOLECULES. F. Balkenhohl et al., en *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 35, págs. 2288-2337, 1996.

COMBINATORIAL CHEMISTRY, en *Chemical Reviews*, vols. 97, n.º 2, marzo/abril, 1997.

COMBINATORIAL CHEMISTRY IN DRUG DISCOVERY. J. Hogan, en *Nature Biotechnology*, vol. 15, n.º 4, abril 1997.

Química combinatoria virtual

Gracias a la simulación por ordenador de bancos de moléculas obtenidos por química combinatoria podemos centrarnos en la síntesis de sustancias que parecen poseer las propiedades biológicas buscadas

Roger Lahana

Diseñar nuevas moléculas que tengan las propiedades terapéuticas deseadas es el ideal de todo laboratorio farmacéutico. La química combinatoria es un poderoso método de síntesis de nuevas moléculas reales, que la modelización optimiza gracias al análisis de bancos combinatorios virtuales. Antes de sintetizar en la realidad un banco combinatorio, se prueban por programas informáticos adecuados las moléculas virtuales que contiene, para crear en el laboratorio las más prometedoras.

Aunque la modelización molecular se concibió en principio para racionalizar la búsqueda de moléculas nuevas, lo cierto es que hoy ayuda a seleccionar moléculas que encierran un interés potencial obtenidas por química combinatoria.

Durante largo tiempo los algoritmos disponibles en modelización sólo iban dirigidos a una optimización racional de la mejor mimética de una molécula ya conocida (se llama mimética a la molécula con el mismo esqueleto que la molécula madre, pero con grupos ramificados diferentes). Posteriormente, en su carrera hacia nuevas moléculas, los laboratorios farmacéuticos abandonarían este enfoque racional en favor de un tratamiento aleatorio. Se cree que hay más probabilidades de encontrar una molécula nueva interesante probando al azar millones de moléculas que construyendo otra con las características ideales que ésta debería presentar.

En la realidad, los dos enfoques son complementarios. Para que una molécula nueva presente actividad biológica, no basta que sea mimética de una molécula activa conocida. Podría faltarle la estabilidad adecuada o interactuar con dianas diferentes de la diana a la que se apunta, con el riesgo de desencadenar efectos secundarios desastrosos.

Por añadidura, los bancos combinatorios —o quimiotecas— en absoluto se han diseñado al azar: se basan en un motivo molecular particular, el sintón, sobre el cual se formarán variaciones. Estas son cada vez más dirigidas y los químicos tienden a restringir su tamaño (de los millones de moléculas de hace algunos años se ha pasado a unos pocos miles). Tal evolución se debe al desarrollo adquirido por las técnicas de evaluación de la diversidad molecular.

En efecto, en cuanto se ha evaluado el interés potencial de una quimioteca, se reduce su tamaño, empezando por desechar moléculas redundantes. Se comparan luego las quimiotecas virtuales entre sí, para guardar las más prometedoras. De ese modo se optimiza la diversidad dentro de un marco bien definido.

Evaluación de la diversidad molecular

Si bien es fácil afirmar que dos objetos son idénticos, no lo es tanto medir en qué se diferencian. Supongamos, por ejemplo, que se quiera describir la humanidad bajo el prisma de la diversidad. Puede decirse que todos los seres humanos pertenecen a la misma especie, por lo cual son todos idénticos y su diversidad es nula. Después, si se diferencian los humanos por su sexo, se crean dos grupos, y si se afinan todavía más sus características hasta llegar al código genético, se acaba afirmando que la especie humana está constituida por varios miles de millones de individuos, todos diferentes entre sí.

De este modo, dependiendo de los criterios o descriptores, una misma población puede considerarse estrictamente monótona o infinitamente diversa. Supongamos ahora que se clasifica el conjunto de los seres vivos en función de su sexo: un hombre estará entonces más próximo a un mosquito macho que a una mujer. La diversidad depende, ante todo, de los criterios elegidos, y no corresponde a ninguna magnitud física absoluta.

Para medir la diversidad molecular de una quimioteca, se la describe de un modo informático: se trata de una quimioteca virtual, presente sólo en la memoria de un ordenador y dotada, empero, de características bien definidas. Pueden entonces optimizarse las moléculas que prometan tener una actividad biológica interesante, antes de proceder a su síntesis.

Buscando precisar la diversidad molecular, se ha empezado por definirla como lo contrario de la similitud: cuanto menos se parezcan dos moléculas, más diversas serán. Aunque roce la perogrullada, este criterio tiene la ventaja de la sencillez, más aún cuando se disponga de herramientas informáticas de cuantificación de la similitud molecular; sin embargo presenta varios inconvenientes.

Lo mismo que en el ejemplo de la población humana, el criterio de "similitud molecular" es una información útil pero parcial. Además, para evaluar este criterio hemos de comparar las moléculas dos a dos, lo que resulta prohibitivo cuando las series contienen más de unas pocas decenas de moléculas (el número de cálculos necesarios varía en razón del cuadrado del número de moléculas), o en química combinatoria cuando han de tratarse decenas o centenares de miles de moléculas. Supongamos que el ordenador tarda un segundo en efectuar cada cálculo de evaluación

Roger LAHANA es director de modelización molecular de la Sociedad Synt:em.

del índice de similitud; para una quimioteca de 100.000 moléculas, ¡se necesitarían más de tres siglos!

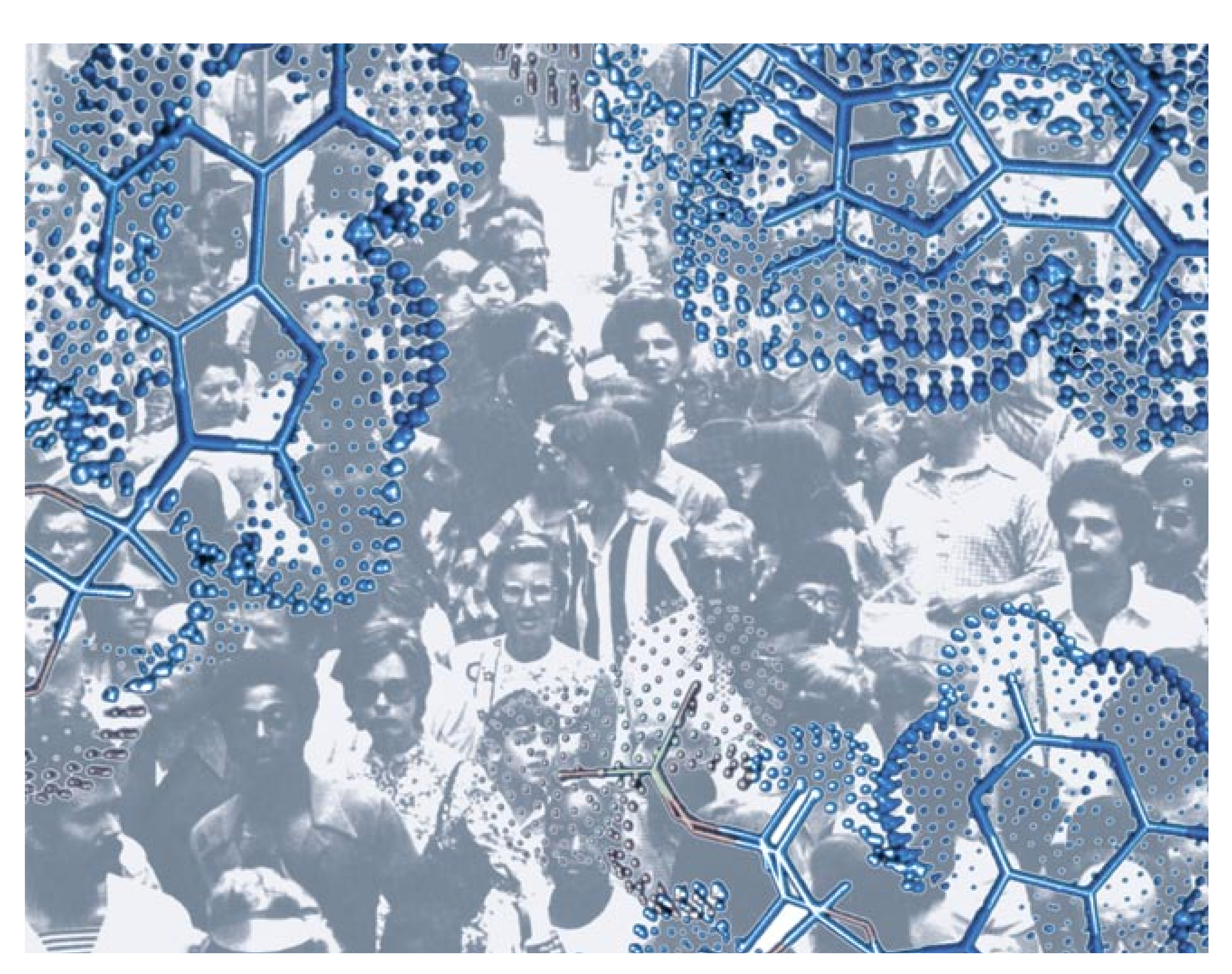
Para paliar esta dificultad, los químicos han descrito entonces las moléculas de un banco por medio de funciones específicas, denominadas farmacóforos. Un farmacóforo es una combinación de grupos químicos, algunas de cuyas características, como la carga o la afinidad por el agua, confieren actividad biológica a la molécula que los soporta. Las propiedades difieren según la naturaleza de los grupos que constituyen los farmacóforos y según la distancia que los separa.

Supongamos que se define un farmacóforo como todos los triángulos formados por tres tipos de grupos químicos. Cada triángulo viene descrito por sus tres vértices y por las longitudes de sus tres lados. Si se considera la elección entre seis tipos de grupos diferentes, hay 216 combinaciones de vértices posibles ($6 \times 6 \times 6$); si la distancia que separa dos vértices puede recibir 10 valores diferentes, se obtienen 1000 combinaciones de longitudes de lados distintas ($10 \times 10 \times 10$). Ahora bien, algunas combinaciones de longitudes son geométricamente imposibles en un triángulo, lo cual reduce el número a unas 500 posibilidades. Para codificar de modo informático el conjunto de estas combinaciones, es decir, 500 triángulos que soportan los 216 farmacóforos citados, se definen 108.000 posibles valores (500×216) por molécula, valores que se denominan claves.

Este método plantea algunos inconvenientes: un farmacóforo puede estar definido por más de tres centros, lo que aumenta exponencialmente el tamaño de la clave. Si el farmacóforo se asimila a un tetraedro, con sus cuatro vértices y seis aristas, la clave informática de una molécula es cerca de 10.000 veces más voluminosa que la del farmacóforo de tres vértices. En tales condiciones es difícil de tratar series de centenares de miles de moléculas (el espacio de memoria necesario sería igual a 1000 gigaoctetos para 100.000 moléculas, y el disco duro de una estación de trabajo raramente supera los diez gigaoctetos).

Descripción completa de la diversidad molecular

Nos enfrentamos siempre con la misma cuestión: cómo explicar del modo más exhaustivo posible la diversidad molecular. El método que proponemos describe completamente una molécula por medio de cientos de parámetros: masa, volumen, número de átomos que contiene, carga,



DE LA DIVERSIDAD GENETICA a la diversidad molecular: como ladrillos combinados por los constructores, los genes configuran miles de millones de seres humanos diferentes. Igualmente, la química combinatoria crea innumerables moléculas a partir de elementos bien escogidos. La simulación por ordenador de bancos combinatorios virtuales permite no sintetizar más que las moléculas potencialmente interesantes.

solubilidad, presencia o ausencia de ciertos grupos químicos, topología (ramificación de sus enlaces, por ejemplo), reactividad, coste de su síntesis y disponibilidad comercial de los reactivos. Un análisis estadístico preliminar de las variables permite seleccionar las que sean más pertinentes. Así, cuando se explora una quimioteca de péptidos, moléculas muy flexibles, se utilizan preferentemente todos los descriptores que no dependen de la geometría de la molécula sino únicamente de su topología, la cual permanece idéntica sea cual fuere su geometría.

El conjunto de las claves permite definir la diversidad de una quimioteca, comparar dos quimiotecas y caracterizar los "huecos" de diversidad, es decir, las regiones de variaciones no descritas por ciertas variables. Fácilmente se calcula las distancias que separan las moléculas en el espacio de sus descriptores: cuanto mayor sea la distancia que separa dos moléculas, más diversas serán estas moléculas con relación a los descriptores utilizados.

Cuando se diseña una quimioteca virtual, se limita su tamaño evaluando la diversidad aportada por cada nueva molécula. Si el enriquecimiento en diversidad es suficiente, la molécula se añade al banco combinatorio, y si no lo es se la rechaza (será inútil sintetizarla, ya que a priori no aporta ninguna información complementaria con respecto a las moléculas ya presentes en el banco).

Una vez creada la quimioteca virtual, un análisis estadístico puede reducir aún más el tamaño del banco a costa de una pérdida limitada de información.

Nuevos inmunosupresores

Hemos aplicado nuestro método a la búsqueda de inmunosupresores, que limitan, y hasta suprimen, las reacciones del sistema inmunitario, causantes en especial de los rechazos a trasplantes. Cierta molécula activa se había probado con bastante éxito en los trasplantes de corazón practicados en ratas, pero no tenía estabilidad suficiente para mantener su actividad en el hombre. ¿Cómo encontrar una molécula de igual actividad, pero más estable?

La primera molécula activa era un péptido, es decir, una cadena de aminoácidos. Al comparar su secuencia con la de otros péptidos muy próximos cuya actividad se había medido experimentalmente, descubrimos que se podía hacer variar seis aminoácidos y que ciertos descriptores permitían separar las moléculas activas de las inactivas.

Para este estudio disponíamos de 35 tipos diferentes de aminoácidos (los 20 naturales y otros 15 artificiales) y en el banco combinatorio potencial había cerca de 2000 millones de moléculas, ¡demasiado, hasta para la población total de ordenadores del planeta! Afortunadamente, las seis posiciones variables estaban sometidas a diversas restricciones fisicoquímicas y ciertas combinaciones no aportaban diversidad alguna al banco. Además, sabíamos que no podría realizarse la síntesis de determinadas combinaciones de aminoácidos, razón por la cual las eliminamos de la quimioteca virtual.

Nos quedaron entonces "solamente" 279.936 moléculas virtuales que probar. Tras afinar de nuevo los criterios de selección, este número se redujo a cinco moléculas, que presentaban las características necesarias para ser biológicamente activas *in vivo*. Sólo se han sintetizado realmente esas cinco moléculas, ensayadas luego en ratas sometidas a trasplante. Cuatro de las cinco moléculas han demostrado mayor actividad que la molécula inicialmente ensayada. Una de ellas es unas 1000 veces más activa: las ratas tratadas por ese inmunosupresor mueren de vejez sin haber rechazado el corazón recibido por trasplante.

La química combinatoria es un poderoso instrumento de acceso a la biodiversidad. La selección de moléculas que en potencia tienen la mejor actividad se optimiza mediante la química combinatoria virtual. Gracias a esta estrategia, sintetizamos solamente las moléculas que ha seleccionado el ordenador, se prueban éstas en el animal y, finalmente, en el hombre.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

LES OUTILS DE LA MODÉLISATION MOLÉCULAIRE. R. Lahana, en *Biofutur, Technoscope*, n.º 144, págs. 1-8, 1995.

SIMILITUDE MOLÉCULAIRE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE. R. Lahana, en *Pour la Science*, n.º 212, págs. 54-60, 1995.

RATIONAL CHOICE OF MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION PARAMETERS THROUGH THE USE OF CONFORMATIONAL AUTOCORRELATION 3-D METHOD. A. Yasri et al., en *Protein Engineering*, vol. 9, n.º 11, págs. 959-976, 1996.

Péptidos sintéticos

Contra el virus de la hepatitis A

La mayoría de las enfermedades asociadas al hígado se producen por infección vírica. Hasta seis virus distintos se han descrito como causantes de los diversos tipos de hepatitis a que se halla expuesto el hombre: A, B, C, D, E y G.

La hepatitis A es una enfermedad necroinflamatoria aguda del hígado, cuyo agente causal es el "virus A de la hepatitis" (HAV). Con un un período medio de incubación de un mes, la infección vírica desencadena una sintomatología inespecífica (ictericia, fatiga, fiebre y otros). La patología se diagnostica tras la determinación de anticuerpos antivirus en el suero del paciente. Se trata de una enfermedad endémica en muchos lugares del mundo, con especial predominio en la cuenca mediterránea. Los estudios epidemiológicos de prevalencia de anticuerpos frente al HAV en España a principios de los años noventa cifran en más del 80 % de la población adulta los que han sufrido la infección, guarismo que contrasta con el 3 % y el 40 % de Escandinavia y Estados Unidos, respectivamente. Se estima que hasta un 50 % de los casos clínicos descritos de hepatitis en los Estados Unidos y en la Comunidad Europea están causados por el virus de la hepatitis A.

Debido a su mecanismo de transmisión fecal-oral, son frecuentes los brotes epidémicos de hepatitis A producidos por el consumo de agua y alimentos contaminados. La mejora general de las condiciones higiénicas de la población ha retrasado a una edad más tardía el momento de la infección. Pese a considerarse, en general, una enfermedad de buen pronóstico, pues no cronifica, pueden en ocasiones aparecer complicaciones que la hacen mortal. Desenlace fatal que suele ir asociado a la presencia concomitante de hepatitis preexistentes de otro origen.

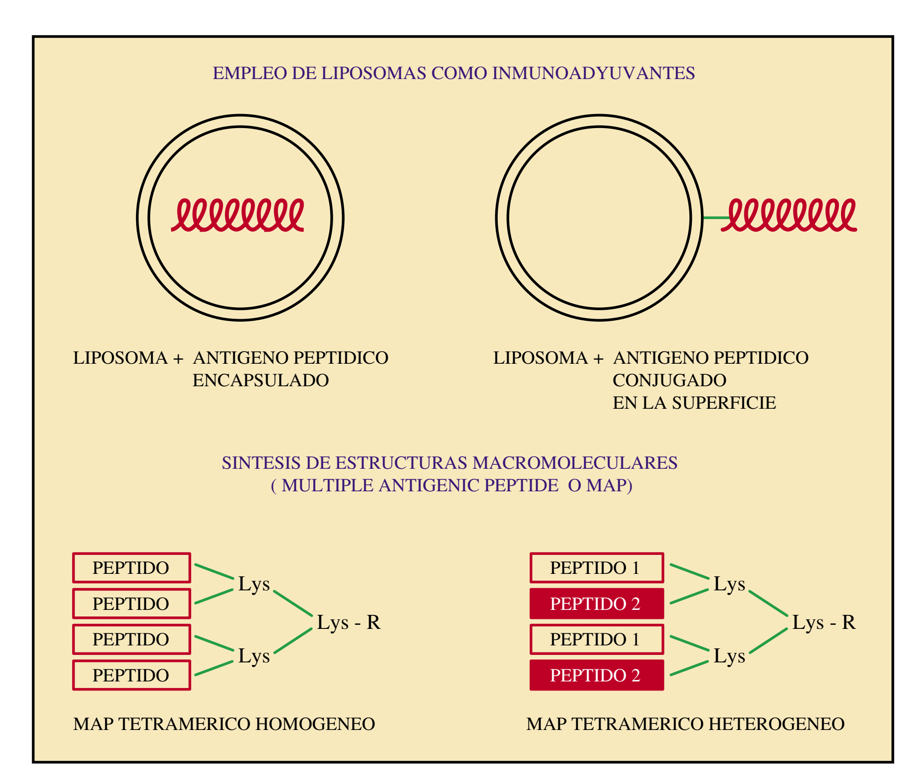
El virus de la hepatitis A es un picornavirus perteneciente al género de los *Hepatovirus*. Mide sólo 27 nanómetros. Consta de una cadena de ARN, tiene simetría icosaédrica y su cápside está constituida por cuatro proteínas estructurales, VP1, VP2, VP3 y VP4. Resulta estable al tratamiento ácido y al éter, y mucho más resistente a la inactivación térmica que otros picornavirus. Presenta una muy pobre replicación en cultivos celulares, lo que dificulta su estudio y aislamiento de muestras ambientales, así como el desarrollo de vacunas por métodos tradicionales (virus atenuados o inactivados).

A diferencia de la complejidad serotípica que caracteriza a otros virus, el de la hepatitis A presenta muy poca variabilidad antigénica. Sólo se ha descrito un serotipo del virus. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de cepas aisladas de distintas áreas geográficas revelan un grado de identidad superior al 90 %. Ello significa que la hepatitis A es una enfermedad con posibilidades de ser erradicada tras una vacunación eficaz mediante aproximaciones moleculares.

La estrategia para erradicar las hepatitis infecciosas debe centrarse en dos aspectos básicos: por un lado, la eliminación del agente infeccioso del entorno mediante el control y las medidas higiénicas adecuadas y, por otro, el desarrollo de una vacuna eficaz frente al patógeno que la origina.

En el desarrollo de la vacuna antihepatitis A hubo que superar varias etapas. Inicialmente, la administración, preventiva o durante el período de incubación, de inmunoglobulinas humanas confería protección frente a la hepatitis A. Pero el tiempo de protección dependía de la dosis; unas dosis muy elevadas sólo cubrían un intervalo de seis meses.

Más tarde, conseguida la replicación del virus en cultivos celulares, se introdujeron las técnicas de inmunización activa. Tras reducir la



Los liposomas (vesículas lipídicas no tóxicas, biodegradables y sin efectos secundarios) potencian la respuesta inmunitaria contra el antígeno que contienen (encapsulado en el compartimento acuoso interno o localizado en la superficie). Los MAP (estructuras ramificadas con fórmula química bien definida) maximizan la concentración de antígeno, generan altos niveles de anticuerpos y evitan la ambigüedad química asociada al empleo de proteínas portadoras

capacidad infecciosa del HAV sin disminuir su eficacia protectora se obtuvo una vacuna atenuada. Pese a todo, no se alcanzaron unos resultados plenamente satisfactorios, ya que los virus atenuados presentaban una capacidad muy limitada de replicación en humanos y, por tanto, proporcionaban una respuesta de anticuerpos muy baja.

En el año 1992, investigadores de los laboratorios Smith Kline & Beecham lograron la primera vacuna eficaz antihepatitis A. Consiste en una suspensión estéril que contiene la cepa HM175 del virus de la hepatitis A inactivado con formalina y adsorbido en hidróxido de aluminio. La vacuna confiere inmunidad frente a la infección por el virus HAV, siendo el título medio de anticuerpos producido sensiblemente mayor que el observado tras la inmunización pasiva con inmunoglobulinas. Más recientemente, los laboratorios Pasteur Merieux Serums & Vaccines y Merck, Sharp & Dohme han desarrollado nuevas vacunas inactivadas antihepatitis A, utilizando las cepas del virus GBM y CR326F, respectivamente.

Sin embargo, en todos los casos mencionados se trata de vacunas de origen biológico a las que pueden asociarse ciertos inconvenientes que derivan de su procedencia (posibilidad de transmisión de efectos secundarios, dificultad de producción y manejo). El diseño de vacunas de origen químico evitaría estas dificultades.

En este sentido desde 1989, en el departamento de química de péptidos y proteínas del Centro de Investigación y Desarrollo del CSIC en Barcelona se viene trabajando, en colaboración con las facultades de biología y farmacia de la Universidad de Barcelona, en un proyecto basado en la obtención de péptidos sintéticos candidatos a formar parte de una futura vacuna química contra la hepatitis A.

Los pasos a seguir en el diseño y desarrollo de una vacuna peptídica se resumen en cuatro: a) selección del fragmento o fragmentos peptídicos a partir de la estructura primaria de las proteínas víricas; b) síntesis química y presentación adecuada mediante el empleo de portadores y adyuvantes que potencien su respuesta inmunitaria, c) inmunización y posterior evaluación inmunoquímica de los anticuerpos generados en animales de experimentación y d) estudio de la protección que se genera *in vivo*.

En nuestro laboratorio se han sintetizado péptidos seleccionados a partir de las proteínas de la cápside del virus. El método empleado ha sido el de síntesis en fase sólida. Se les han administrado a ratones de experimentación, en diversas formas de presentación, con el fin de potenciar su respuesta inmunitaria: libres, acoplados a proteínas portadoras, encapsulados en el interior acuoso de liposomas o unidos covalentemente en la superficie de los mismos y en forma de construcciones macromoleculares ramificadas.

Los niveles de anticuerpos generados en líquidos ascíticos se han sometido a una doble valoración mediante ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA): primero, en cuanto a su capacidad de reconocer al péptido que los había generado y, segundo, al virus completo. Asimismo, se han realizado ensayos de neutralización de la capacidad infectiva del HAV.

De todos los péptidos sintéticos analizados por nuestro grupo, los que han proporcionado una respuesta anti-HAV de mayor intensidad han sido los pertenecientes a la proteína VP3 y que contienen la secuencia arginina-glicina-aspártico. Según es sabido, este tripéptido interviene de una manera decisiva en la adherencia de otros picornavirus a las células hospedadoras. El suero de pacientes humanos reconoce los péptidos-VP3 y éstos generan anticuerpos que identifican y neutralizan al virus hasta en un 90 %. Asimismo, la administración de péptidos-VP3, encapsulados en liposomas, da lugar a títulos de anticuerpos más elevados que al administrarlos en forma libre.

Podemos, pues, concluir que el camino iniciado para diseñar una vacuna multicomponente de origen químico contra la hepatitis A constituye una de las opciones alternativas más atractivas a la actual vacuna. Se alcanza una elevada pureza, se obtiene una estructura perfectamente definida y se tiene la completa seguridad de estas preparaciones. El diseño de nuevas vacunas de origen peptídico implicará, además, la mejora de la inmunorrespuesta mediante el empleo de nuevos adyuvantes que potencien la producción de anticuerpos antivirus. No debe olvidarse que los péptidos cuentan con una baja inmunogenicidad, en comparación con la generada por el patógeno.

ISABEL HARO VILLAR
Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC, Barcelona

Difusión

Sistemas multicomponentes

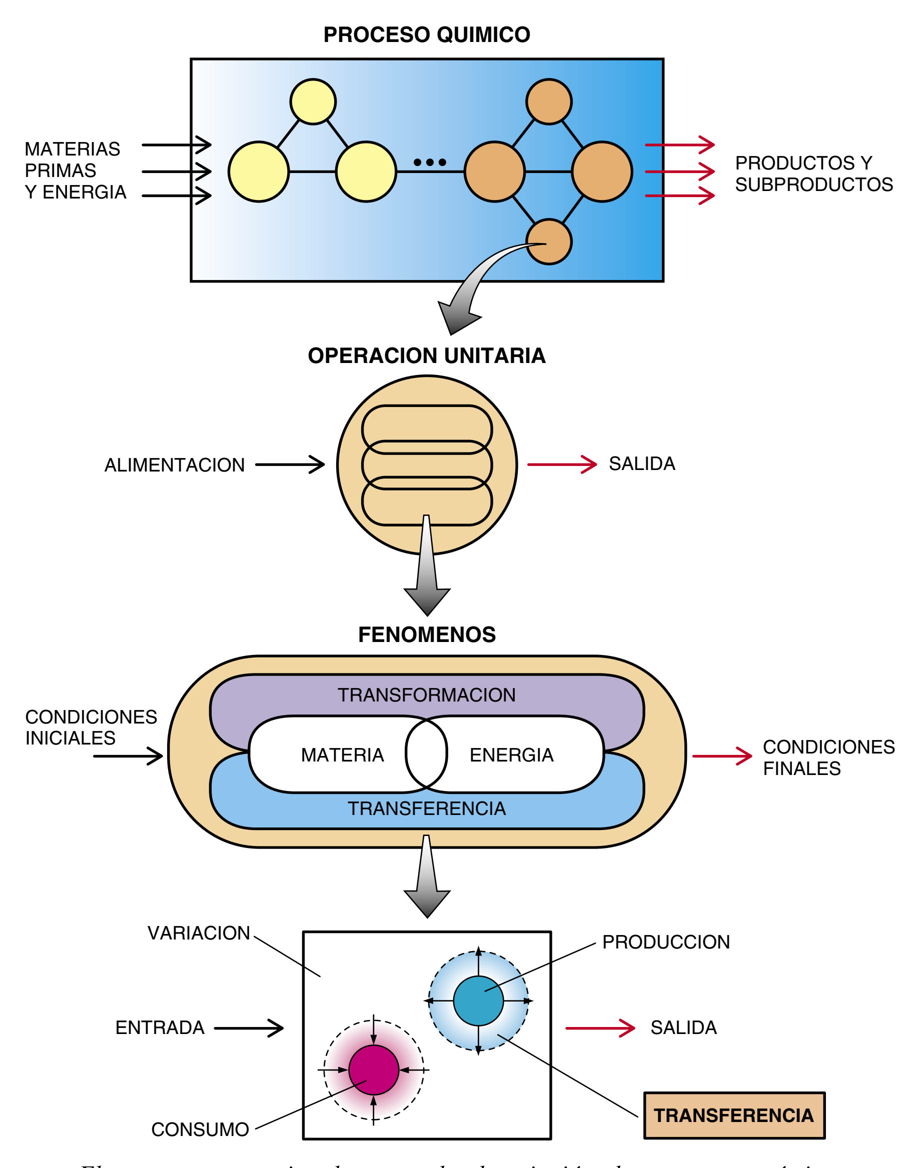
Numerosos fenómenos de difusión forman parte de la vida cotidiana. Lavarse, preparar una infusión, acondicionar el aire de la sala, eliminar los olores del frigorífico son ejemplos de fenómenos de transferencia de materia, cuya componente intrínseca es la difusión molecular.

Estos y otros fenómenos, como los de transmisión de calor y los de transferencia de cantidad de movimiento, se dan en los procesos técnicos, configurando lo que se ha dado en llamar unidades de proceso u operaciones básicas: extracción, lixiviación, adsorción, destilación, evaporación, cristalización y otros. Estas operaciones suelen distinguirse como elementos diferenciados —equipos y aparatos—, pero frecuentemente no se pueden establecer correspondencias biunívocas entre el fenómeno y la operación, ni entre la operación y el elemento, ya que en muchas operaciones complejas se encuentran implicadas varias operaciones y, entreverados en ellas, los tres fenómenos de transporte molecular citados.

La finalidad de las operaciones básicas o unitarias suele ser la de desplazar materia y energía, adecuar velocidades, temperaturas o composiciones y separar especies químicas. El grupo más importante de operaciones de transporte forma parte de las llamadas operaciones de separación, cuya finalidad es concentrar o aislar fases, especies o iones, con el objeto de recuperarlas, adecuar la composición de sus mezclas o disoluciones o bien depurar efluentes.

El concepto de operación unitaria permite estudiar sistemáticamente miles de procesos, sobre la base de la combinación de menos de un centenar de operaciones básicas. Gracias a la idea de fenómeno de transporte podemos abordar decenas de operaciones agrupadas según la naturaleza del cambio producido: operaciones de transformación y operaciones de transferencia, transmisión o transporte.

En el análisis o el diseño de una operación se parte de tres supuestos, al menos: los cambios suceden involucrando unas cuantías de materia y de energía (estequiometría), lo hacen hasta un límite impuesto por la naturaleza (estado de equilibrio termodinámico), transcurren con una velocidad (cinética) y lo hacen por unos caminos (mecanismos) que dependen de los



Elementos convencionales para la descripción de procesos químicos

elementos intrínsecos (fenómenos de dinámica molecular) y de muy diversos factores circunstanciales.

Las operaciones de separación se clasifican en operaciones de equilibrio y operaciones de velocidad. En las primeras la componente cinética del proceso es importante —cuanto más rápido ocurran los fenómenos más se podrá ahorrar en volumen de instalación o en tiempo de operación—, pero no es decisiva para el rendimiento, ya que éste depende de las condiciones de equilibrio alcanzables por un sistema dado (por ejemplo, la cantidad de azúcar precisa para saturar un té o un café). En las segundas, la diferencia de velocidad con la que cada sustancia difunde es un factor discriminador decisivo, como sucede en bebidas, perfumes o fármacos, de los que se espera un mensaje dosificado en el tiempo, un "espectro" o un "cromatograma".

La adecuada formulación de los balances permite describir cualquier situación en función de distintas contribuciones, entre las que se encuentra la intensidad del tránsito de propiedad por transporte intrínseco o molecular. Corresponde a la cinética química el estudio de los mecanismos por los que transcurren las transformaciones; a la cinética física, el de los mecanismos por los que transcurre el transporte.

Generalmente se parte de una descripción microscópica del fenómeno, fundamento de su interpretación macroscópica. En el ámbito de la macroscopía se formulan los balances globales en conexión con el entorno real. En el ámbito de la microscopía se centra la atención en pequeñas regiones del proceso representativas y en las que se supone que la materia es un fluido continuo; en este nivel se desarrolla la investigación conducente a justificar, estimar y medir las propiedades de transporte implicadas en las leyes de potencial.

Estas leyes son la concreción de una observación empírica según la cual las cosas suceden porque, simultáneamente, algo las impulsa y algo las frena. En el campo del transporte molecular, las leyes de potencial establecen que la densidad de flujo por transporte intrínseco es consecuencia de un potencial y de unos coeficientes o propiedades de transporte (transmitividades o conductividades). De este potencial físico-químico, sólo se perciben algunas reminiscencias, como pueden ser la velocidad, la temperatura, la composición o la tensión eléctrica. La forma de interpretar el potencial, su carácter intrafásico o interfásico, las coordenadas espaciales y temporales necesarias para definir adecuadamente esta densidad de flujo y la formulación matemática del fenómeno, dan forma a los diversos enunciados de la ley de Newton para el transporte de cantidad de movimiento, de las de Fourier, Dufour y Peltier para la transmisión de calor, de las de Soret, Fick y Faraday para la transferencia de materia o las de Seebeck, Volta y Ohm para el flujo de carga eléctrica.

En el caso particular de la transferencia de materia en el seno de una fase, el mecanismo intrínseco dominante es la dispersión molecular por gradiente de concentración. La conductividad de materia adopta la denominación de "difusividad molecular" o "coeficiente de difusión molecular", siendo ésta una propiedad característica del estado y naturaleza de las sustancias implicadas.

En la industria, los procedimientos usuales para la estimación de coeficientes de difusión molecular revisten enorme interés. Los estudios sobre difusión se iniciaron con experimentos desarrollados en fase de gas por Thomas Graham durante los años 1828 a 1833 quien, sin embargo, no hizo mención del concepto de coeficiente de difusión. Fue Adolf Eugen Fick quien, en 1855, dio a los experimentos de Graham forma matemática, al establecer su ley para la difusión binaria. La difusión podía ser analizada de forma semejante a como hiciera Fourier con la transmisión de calor y Newton para el transporte viscoso de cantidad de movimiento.

A pesar del considerable avance que introdujo la ley de Fick en los estudios sobre transferencia de materia,

su validez no fue absoluta, ni siquiera para describir el comportamiento de sistemas binarios, ya que cuando una mezcla en estado de inequilibrio difunde, el desplazamiento de las moléculas de uno y otro componente puede arrojar un balance neto de masa, volumen o moles en una u otra dirección, además de verse sometida a un flujo global sobreimpuesto.

Ha de tenerse en cuenta también que los coeficientes de difusión molecular pueden ser muy dependientes de la concentración, lo que es inevitable en sistemas difusionales, es decir, en situación de inequilibrio de composición. Ello introduce una considerable complejidad en los cálculos. Esta laguna fue subsanada en parte por Maxwell al establecer, en 1860, la teoría cinética de los gases, un ejemplo de la utilidad de los recursos del nivel atómico-molecular en la interpretación de fenómenos microscópicos.

La difusión por deslizamiento de Knudsen —fenómeno que se produce en poros cuyo diámetro es inferior al recorrido libre medio de las moléculas—, la difusión en las proximidades de los puntos críticos de disoluciones líquidas, así como el tratamiento de determinados sistemas —macromoléculas, detergentes, electrolitos, cristales líquidos— que presentan, a su vez, anisotropía difusional, son algunos de los ejemplos más característicos acerca de las dificultades que se encaran para generalizar la utilización de la forma binaria de la ley de Fick.

Una circunstancia determinante es que las mezclas binarias no suelen existir más que en situaciones muy específicas. La característica básica de la difusión en sistemas multicomponentes la constituye el hecho de que la densidad de flujo de un componente está influida por los gradientes de concentración —potencial— del resto de componentes presentes en el sistema. Esto hace que, aunque en el caso general sea de esperar un incremento de la densidad de flujo de materia al aumentar el potencial, la situación real puede conducir a un retraso en la velocidad de difusión, a su anulación o, incluso, al caso paradójico de sustancias con “difusión negativa”, es decir, que difunden en sentido contrario al sugerido por su gradiente de concentración, hecho que puede ser explicado vía coeficientes de actividad capaces de describir las interacciones entre componentes.

La búsqueda de soluciones al problema de la difusión molecular multicomponente ha llevado a dos líneas de prospección: el establecimiento de nuevas formas de las ecuaciones de flujo y la configuración de técnicas experimentales que permitan caracterizar los efectos perturbadores de la composición sobre la difusividad en los sistemas multicomponentes.

La pretensión de establecer modelos teóricos de difusividades de sistemas multicomponentes es una tarea ingente, si no inabordable con los recursos disponibles. Por ello se han consolidado procedimientos aproximados que tratan de resolver el problema por extensión o por aproximación a formas análogas o precursoras de la ley de Fick, accesibles a través de la termodinámica de procesos irreversibles. Una de estas vías es la generalización de Onsager; otra es la generalización de Stefan-Maxwell y, una tercera, es la generalización de Bird.

La generalización de Onsager describe la densidad de flujo de un componente como la resultante de diversas contribuciones binarias, cada una de ellas debida al gradiente de composición de cada integrante de la mezcla y a una difusividad del compuesto en cuestión basada en dicho gradiente. De esta forma, un fenómeno de difusión multicomponente exige definir tantas difusividades D^{ij} como variaciones binarias con repetición existen de los integrantes de la mezcla.

La segunda vía que permite describir los fenómenos de difusión en sistemas multicomponentes toma como punto de partida la ecuación generalizada de Stefan-Maxwell, en la que es el gradiente de potencial químico de cada componente el que se formula en función de las contribuciones de las velocidades diferenciales medias de cada componente en la mezcla y de los coeficientes de difusión molecular en las distintas mezclas binarias posibles.

Existe, además, una tercera forma de abordar el problema mediante la introducción de coeficientes de difusión eficaces, en la forma de coeficientes de difusión pseudobinarios, D^{im}, que ilustran sobre la difusividad de cada componente en la mezcla. R. B. Bird desarrolló esta idea al adoptar una forma semejante a la ley de difusión de Fick y admitir que la densidad de flujo de un componente en una mezcla con otros componentes se debe, únicamente, a su gradiente de concentración.

Como se ve, el primero y el último de los modelos citados describen la densidad molecular de flujo —propiedad medible— interpretando de diferente forma el fenómeno, lo que lleva a introducir diferentes conceptos de difusividad. El esfuerzo teórico se dirige hacia la interpretación de estos coeficientes desde una modelización rigurosa. El esfuerzo experimental se dirige, en parte, a la determinación de difusividades aparentes y, en parte, a la determinación de difusividades binarias.

Los métodos experimentales desarrollados para la determinación de uno y otro tipo de coeficientes han sido numerosos. El fundamento de los mismos consiste en poner en contacto dos fases que contienen los componentes que difunden y seguir, en función del tiempo y de la posición, la variación de alguna propiedad físico-química que permita la determinación de variaciones de la composición. Entre las propiedades medidas se encuentra la conductividad eléctrica, la cual se determina utilizando electrodos de conductividad introducidos en las celdas. Se han utilizado también trazadores radiactivos y métodos físicos para la medida de composiciones de gases, líquidos o sólidos y, entre éstos, el más común reside en la determinación de la variación del índice de refracción de las disoluciones mediante métodos interferométricos. Las técnicas de Gouy, de Mach-Zehnder o de Rayleigh o los más recientes interferómetros holográficos que utilizan la misma celda como sistema de referencia, se diferencian en la óptica de los equipos y en el tratamiento matemático de los datos. La precisión de los métodos interferométricos es muy buena, del orden de 0,1 a 0,2 % y, por ello, son los métodos de mayor fiabilidad para el conocimiento de esta propiedad de los sistemas multicomponentes.

Probablemente la investigación en este campo deba orientarse más hacia la experimentación que hacia el desarrollo de nuevas formas de las ecuaciones de flujo. Tampoco parece muy apremiante el desarrollo de nuevas técnicas de medida. Sin embargo, el análisis experimental de sistemas poliméricos, sistemas con membranas, transporte activo en catálisis y biocatálisis, y el estudio de sistemas con reacción química, son ejemplos de problemas que aún continúan planteados en el campo de la difusión molecular en sistemas multicomponentes.

J. Coca, J. L. Bueno
y R. Alvarez
Universidad de Oviedo

Diseño racional de fármacos

Antaño, el azar solía conducir al descubrimiento de un nuevo fármaco. Hoy, el avance registrado en biología molecular, análisis de estructuras y técnica de computación permite el diseño de sustancias terapéuticas

Gerd Folkers y Hugo Kubinyi

Hace unos cien años, Emil Fi scher (1852-1919) y Paul Ehrlich (1854-1915), químico aquél y médico éste, propusieron, sin previo acuerdo mutuo, mecanismos moleculares para explicar las interacciones entre determinadas sustancias y las estructuras biológicas del organismo. Fischer utilizó el símil de "la llave y la cerradura", en tanto que Ehrlich sugería la idea de la bala mágica como modelo para la moderna investigación farmacológica. Esta bala llevaría el medicamento hasta el foco de la enfermedad, sin dañar los tejidos sanos. El principio de la toxicidad selectiva implica, por su parte, un reconocimiento específico como el propuesto por Fischer.

Pasado el tiempo, el desarrollo experimentado en la instrumentación analítica, la biología molecular y la ingeniería genética, así como el rendimiento conseguido en los ordenadores, han convertido en realidad las intuiciones geniales de estos dos pioneros de la ciencia. Los fundamentos que se propusieron para avanzar en la investigación —definición molecular de la enfermedad y diseño dirigido de un agente molecular interactivo— constituyen la base del actual diseño de fármacos.

El desarrollo planificado de un medicamento —su desarrollo racional— no se funda en una descripción fenomenológica, sino en los mecanismos moleculares responsables del cuadro clínico. Con ello se permite el acceso programado del fármaco a un lugar determinado del organismo y, además, se tiene la ventaja de poder estudiar sus efectos *in vitro* (en sistemas aislados y en cultivos celulares) en vez de tener que hacerlo *in vivo*.

El primer paso consiste en identificar las moléculas que participan en una función bioquímica alterada. Muchas enfermedades se deben a defectos congénitos o alteraciones en los mecanismos reguladores. Si se acotan los genes responsables, podemos multiplicarlos ("amplificarlos") mediante la reacción en cadena de la polimerasa e introducirlos en bacterias o levaduras. Estos microorganismos fabricarán grandes cantidades de las proteínas cifradas por dichos genes, paso necesario para analizar las relaciones entre su estructura y la función que desempeñan. Obtenemos así información no sólo del defecto en cuestión, sino también de las medidas a tomar para diseñar productos sintéticos capaces de corregirlo. Estos productos deben tener una estructura que, de acuerdo con el principio de la llave y la cerradura, encajarán exactamente en la del lugar de la molécula diana.

Pero hay más. El medicamento ha de llegar, desde el lugar de su aplicación hasta el punto de actuación, sin que en el trayecto sufra agresión enzimática. Además, para que el fármaco cumpla su misión deberá permanecer cierto tiempo en el organismo. La mayoría de los medicamentos se administran por vía oral. Después de ingerido, el fármaco ha de disolverse en el estómago o en el intestino y, a través de las paredes del tracto digestivo, alcanzar el torrente circulatorio. Para ello necesita atravesar diversas membranas lipídicas, por lo que ha de ser soluble tanto en el agua como en las grasas, condiciones que satisfacen sustancias de moderada lipofilia. Particularmente apropiadas son las bases o los ácidos orgánicos débiles; pueden operar como sustancias neutras no polares liposolubles o bien de forma ionizada con buena hidrosolubilidad. Los ácidos y las sustancias lipofílicas neutras suelen absorberse ya en el estómago, donde hay un medio ácido; por contra, las bases o las sustancias neutras polares lo suelen hacer en el intestino, donde el medio es neutro o ligeramente alcalino.

La siguiente barrera a superar está en el hígado. Toda la sangre que irriga la pared del intestino llega, a través de la vena porta, a este órgano que, entre otras misiones, tiene la de eliminar las sustancias extrañas al organismo. Algunas sustancias, sobre todo las muy liposolubles o las de peso molecular superior a los 500 o 600 dalton, al pasar por el hígado se devuelven inmediatamente al intestino con la bilis que produce el propio hígado. De la degradación de otras sustancias se ocupa toda una batería de enzimas hidrolíticas y oxidativas, que las transforman, por lo común, en productos inactivos y desechables. En los casos más desfavorables esas sustancias secundarias son tóxicas. Los productos en que esto ocurre se descartan de entrada y no se consideran aptos para medicación.

Por otra parte, las enzimas metabólicas del hígado o de otros órganos pueden utilizarse intencionadamente para la liberación de una sustancia activa a partir de una precursora con buena biodisponibilidad (profármaco). Este concepto de profármaco es un principio importante a la hora del diseño de nuevos medicamentos.

Nos ofrecen un ejemplo de ello los medicamentos empleados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. El cerebro de los pacien-

GERD FOLKERS y HUGO KUBINYI son expertos en el diseño de medicamentos. Folkers, director de *QSAR* y *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, enseña química farmacéutica en la Escuela Técnica Superior de Zurich. Kubinyi simultanea la dirección del departamento de diseño de fármacos en el laboratorio central de la empresa BASF AG en Ludwigshafen con la docencia en la Universidad de Heidelberg.

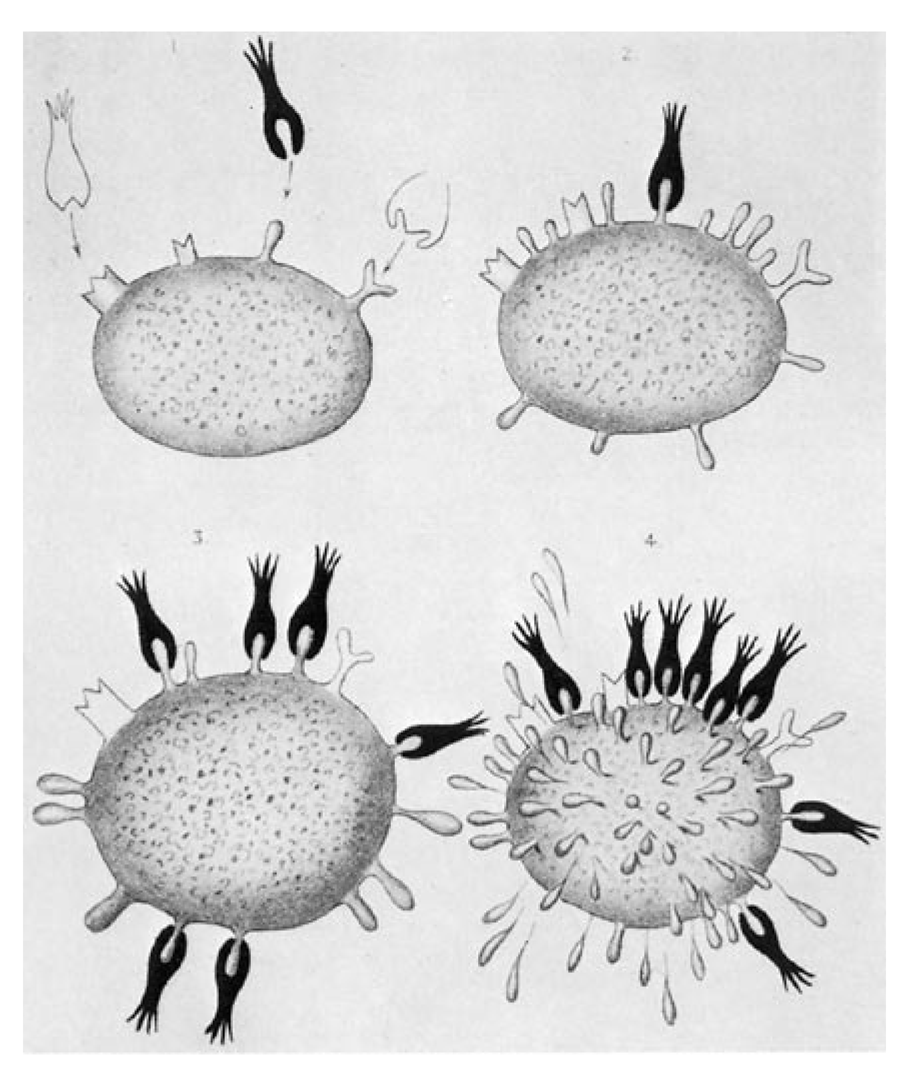
tes sufre escasez de dopamina. Este neurotransmisor, muy polar, no está biodisponible ni puede atravesar la barrera hematoencefálica. Pero contamos con un aminoácido similar a la dopamina —la L-dopa— que puede introducirse activamente en el cerebro, con consumo energético, mediante un vector especial de aminoácidos; una vez allí, la dopa-decarboxilasa puede liberar la dopamina que se necesite.

Ahora bien, esta enzima no sólo actúa en el cerebro sino también en el resto del organismo. Y la dopamina liberada en otros lugares puede originar efectos secundarios perniciosos. Utilizando un inhibidor de la dopa-decarboxilasa, que por su carácter polar no atraviesa la barrera hematoencefálica, se evita que en el torrente circulatorio la L-dopa se transforme en el neurotransmisor. Administrando un inhibidor de la monoaminooxidasa, enzima que degrada la dopamina y que se presenta sobre todo en el cerebro, se consigue prolongar al máximo la acción de la dopamina.

Los fármacos actúan, de preferencia, sobre enzimas, receptores, transportadores, canales iónicos y proteínas señalizadoras. Unos inhiben reacciones catalizadas por proteínas; otros actúan sobre receptores y ejercen funciones agonistas similares a las de las sustancias transportadoras del organismo o funciones antagonistas con el efecto contrario, compitiendo por el acceso de los transportadores a los receptores o modificando la estructura tridimensional del receptor. En el caso de los transportadores pueden neutralizarse también las sustancias que, en situaciones normales, los estimulan. Si se trata de canales iónicos, el fármaco puede estabilizar la forma abierta o la cerrada. Finalmente las proteínas señalizadoras regulan las actividades de enzimas, receptores o canales iónicos y sobre ellas pueden actuar los medicamentos.

En todos estos casos resulta decisivo que el fármaco, una vez alcanzado determinado lugar del organismo, tome contacto con las estructuras biológicas o bloquee la interacción con el auténtico agente previsto.

Los fármacos tienen por diana asociaciones de muchas moléculas o macromoléculas; la mayoría de las veces, proteínas cuyas cadenas pueden constar de miles de aminoácidos y dibujan complejas formaciones tridimensionales. Su función depende de la localización de la proteína en el tejido. Si está incluida en una membrana celular y actúa como transmisora de una señal, se tratará a buen seguro de un receptor. Pero las proteínas de membrana pueden ser también canales iónicos, poros o bombas relacionadas con el transporte. Sucede a veces que este sistema de transporte lo configuran varias proteínas; lo hemos visto en los vectores de aminoácidos que vehiculan selectivamente componentes de importancia vital hasta el interior de la célula y, a través de la barrera hematoencefálica, hasta el sistema nervioso central. Acontece también con las proteínas multirresistentes, que expulsan de la célula sustancias indeseables (fármacos incluidos).

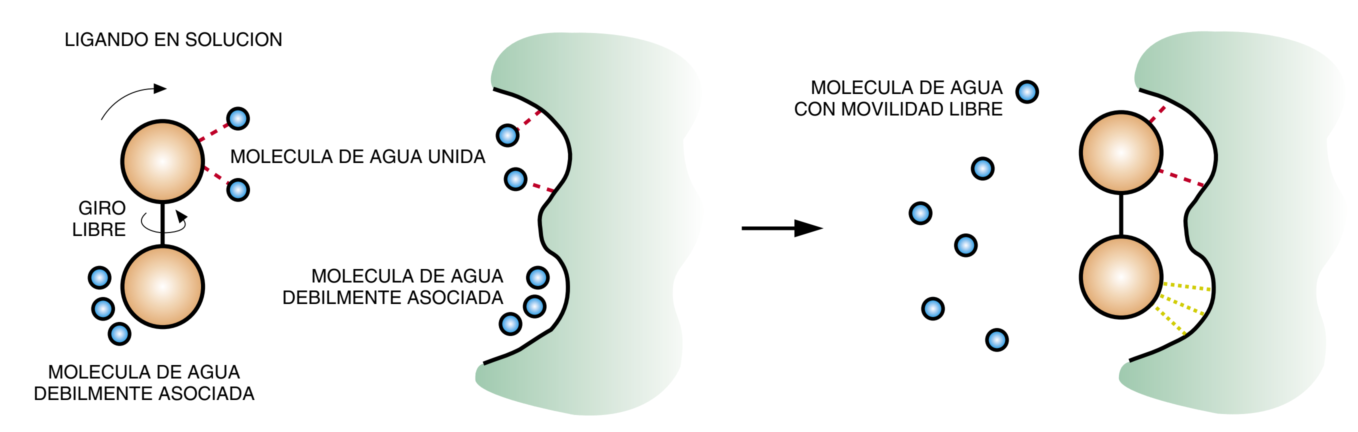


1. LAS IDEAS SOBRE INTERACCIONES específicas entre unos receptores situados en la superficie de la célula y sus ligandos, expuestas ya en 1900 por Paul Ehrlich (1854-1915) y plasmadas en figuras dibujadas por su propia mano, en líneas generales, siguen siendo válidas hoy en día.

Las proteínas que circulan disueltas por el interior de la célula (en el citoplasma) o por el torrente sanguíneo, además de actuar como vehículos transportadores, desempeñan funciones catalíticas: por su condición de enzimas intervienen en el anabolismo y el catabolismo. Objetivos particularmente apropiados para la actuación de los fármacos son las proteínas que participan en la síntesis o en el metabolismo de sustancias mensajeras propias del organismo o bien que sean responsables de la activación o desactivación de procesos de señalización en la célula.

Sin embargo, no todas las proteínas son solubles ni todos los receptores se hallan integrados en las membranas. En el proceso de optimización operado en el curso de la evolución algunas enzimas quedaron ancladas en la superficie de la membrana junto a cadenas lipofílicas laterales. Estas consideraciones evolutivas encierran interés para el análisis de las relaciones entre estructura y función, así como para el diseño de fármacos en ellas basado.

Todas las proteínas tienen puntos de anclaje específicos para las moléculas que se conjugan a ellas. Por regla



2. PARA QUE UN LIGANDO quede trabado en un receptor no sólo debe tener la forma complementaria adecuada con que acoplarse a la superficie de la bolsa de enlace del receptor, sino que también debe poder entablar con ella interacciones energéticas favorables. Entre los factores que influyen destacan los puentes de hidrógeno (*líneas rojas*). La polarización de las superficies moleculares contribuye a la energía del enlace. La fuerza de la interacción debe superar la energía necesaria para expulsar las moléculas de agua atrapadas en los ligandos libres y en las bolsas de enlace vacías. Interviene, también, la tendencia de los sistemas a aumentar la entropía (desorden). Así, la entropía del ligando libre en la solución, donde puede moverse y girar aleatoriamente sin ningún obstáculo, es mayor que cuando está trabado al receptor. Por otra parte la liberación de moléculas de agua aumenta su entropía. Se privilegia la situación enfrentada de las superficies hidrófobas (*línea amarilla*); en ellas las moléculas de agua están muy poco asociadas sin tener saturados del todo sus puentes de hidrógeno. Su liberación eleva la entropía del sistema.

general, estos ligandos son sustancias naturales del organismo: hormonas, aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares, grasas y metabolitos; en su mayoría, con un peso molecular inferior a los 1000 dalton.

Pero hay excepciones. Así, las enzimas del tracto digestivo que intervienen en el procesamiento de los alimentos tienen que trabarse y actuar sobre grandes biopolímeros. A pesar de ello pueden quedar bloqueados por sustancias de bajo peso molecular que, por su forma, se acoplen a los lugares de unión y se fijen a ellos con más fuerza que las moléculas que lo hacen en condiciones naturales. Estamos hablando de la inhibición competitiva.

Un caso diferente es cuando el fármaco se sitúa en un punto distinto del de anclaje de las moléculas naturales, alterando en consecuencia el desarrollo de la proteína. Si al mismo tiempo resulta afectada la configuración del lugar de acoplamiento y las moléculas que acostumbran acoplarse allí no pueden hacerlo, se resentirá la función de la proteína. Nos referimos a la inhibición alostérica; ésta se presenta sobre todo en las proteínas de membrana, a diferencia de la inhibición competitiva que predomina en las enzimas.

Además de inhibir los receptores transmisores de señales y los canales iónicos, los fármacos pueden estimular unos y otros. Para ello se requieren las mismas e incluso mayores exigencias de exactitud en el encaje; las activaciones inexactas o demasiado frecuentes de las vías de transducción de las señales, desventajosas para el organismo, se han ido abandonando a lo largo de la evolución.

El ácido desoxirribonucleico (ADN), substrato de la herencia, representa otro objetivo fundamental para las moléculas de fármacos. En el ADN se hallan cifrados los planes estructurales de las proteínas. En su interpretación intervienen proteínas señalizadoras, situadas específicamente en determinados fragmentos de la molécula nucleica. Ciertos medicamentos inhiben este proceso al ocupar surcos de la doble hélice o al adoptar una forma plana e intercalarse entre bases del ADN. Pueden optar por otra vía alternativa, a saber, la de asociarse a proteínas reguladoras e impedir que desempeñen su función. A través del contacto directo con el ADN se desarrollan algunas terapias antitumorales. Parece ser que también es así como ejercen su acción las hormonas esteroideas.

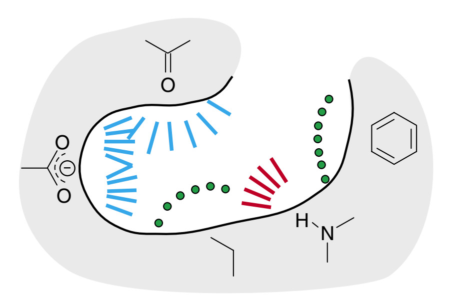
Antaño desatendidas, las membranas han pasado de un tiempo a esta parte a convertirse en punto de mira de los fármacos. Amén de estabilizar las proteínas incluidas en ellas, pueden, en determinados casos, regularlas alostéricamente. Las membranas constan de una doble capa de moléculas de ácidos grasos. Moléculas planas y rígidas en ella incluidas, como la del esteroide colesterina, le proporcionan la necesaria consistencia.

En tal configuración se funda la terapia de las infecciones fúngicas. Los hongos utilizan para estabilizar sus membranas el ergosterol, esteroide producido por el propio organismo y desconocido en la especie humana. Si se inhibe la enzima necesaria para ello, se detiene la multiplicación del hongo.

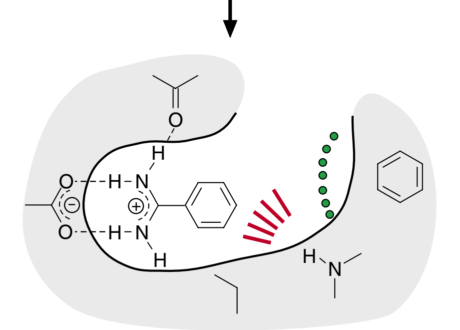
Una vez acotada la diana sobre la que ha de incidir el inhibidor, el agonista o el antagonista, se plantea la creación de una molécula que se acople geométricamente a dicho objetivo. Esta es la misión que cumple el diseño de base estructural. Para que el ligando se fije de forma sólida y duradera, no basta con que tenga una estructura externa adecuada; las interacciones entre determinados átomos o grupos atómicos en el lugar de anclaje y la molécula de la sustancia activa prestan una contribución importante. Puede tratarse de interacciones entre grupos no polares (lipófilos o hidrófobos) o polares (hidrófilos). Entre los últimos sobresalen los puentes de hidrógeno, mediante los cuales un átomo de hidrógeno (H) con una carga parcial positiva, unido a un átomo electronegativo (X), como puede ser el oxígeno o el nitrógeno, atrae a otro átomo con carga parcial negativa (Y), para constituir una disposición del tipo X-H...Y.

Los puentes de hidrógeno son direccionales; aumentan, pues, la selectividad del enlace entre un ligando y su punto de anclaje. Pero su contribución

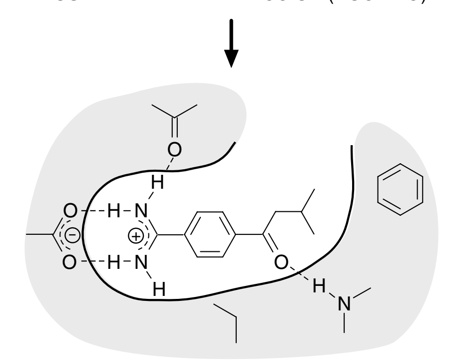
3. PARA EL DISEÑO de nuevos ligandos de proteínas el programa de ordenador LUDI ofrece una valiosa ayuda. Como dato de entrada toma la estructura espacial de una proteína cuyas coordenadas deben disponerse en solución atómica. El químico define un punto de enlace y busca en un banco de datos las estructuras moleculares que puedan actuar como ligandos. A partir de ahí todo se sucede automáticamente. En un primer paso LUDI analiza el punto de enlace y averigua las posiciones del espacio para las que se dispone de estructuras con las que interactuar (*arriba*); aquí se representan los espacios donadores en los puentes de hidrógeno (X-H) con trazos azules, las zonas de aceptación en dichos puentes de hidrógeno (Y) con trazos rojos y las regiones lipófilas con puntos verdes. En el siguiente paso el programa busca, en el banco datos relativos a estructuras, los posibles ligandos examinando hasta qué punto cumplen las exigencias del orden de enlace (*docking*); para ello ensaya un gran número de orientaciones diferentes. El programa va almacenando las moléculas apropiadas junto a la afinidad que se les calcula según una función empírica. En el último paso se incluyen las estructuras encontradas en otros grupos para agotar todas las posibilidades de interacción (*linking*).



ANALISIS DE LA BOLSA DE ENLACE



POSIBILIDAD DE INTERACCION (DOCKING)



INTERACCION EN UN PUNTO (LINKING)

a la afinidad en el complejo varía mucho de unos casos a otros. Si introducimos un grupo hidroxilo (OH) adicional, la afinidad de un ligando por su lugar de anclaje puede elevarse en ocasiones hasta 100 millones de veces, en tanto que en otras ocasiones puede verse disminuida. No ocurre así cuando un resto lipófilo ocupa la bolsa hidrófoba de un lugar de anclaje, que, siendo siempre favorable, aumenta la solidez de la unión. Sólo ha de procurarse que la molécula no sea demasiado no-polar, a fin de que su solubilidad en fases acuosas alcance cierto valor crítico.

Por último hay que prestar atención a la simetría quiral que suelen presentar las moléculas biológicas. Con esa expresión se indica que, de cada molécula, existe su imagen especular de otra (enantiómero), comportándose mutuamente como si fueran la mano (en griego *cheir*) izquierda y derecha. Lo observamos, por ejemplo, en los aminoácidos y, por tanto, también en las proteínas. Lo mismo que para la mano derecha sólo resulta adecuado el correspondiente guante, también las moléculas que se enlazan han de tener la quiralidad adecuada. Se han observado diferencias entre los efectos de uno y otro enantiómero, que en algunos casos pueden llegar a ser de un factor en 500.000. Se ha comprobado en algún caso que el enantiómero de una sustancia activa resultaba tóxico. En la síntesis de un fármaco consideraremos, pues, si desde un principio la molécula encaja en la forma espacial adecuada —estas síntesis aquirales son en todo caso difíciles—, o si se separan posteriormente los dos componentes de la mezcla 1:1 de ambos enantiómeros (racemato).

Para saber qué forma geométrica presenta el lugar de enlace de una enzima y qué átomos ocupan su superficie, podemos valernos del análisis estructural mediante rayos X. Se irradia con rayos X la proteína cristalizada: basándose en el patrón de curvatura que experimentan estos rayos y con ayuda de un computador se puede reconstruir el orden espacial en que se encuentran todos los átomos. Suele bastar con una resolución de 1,5 a 5 angström para observar, por ejemplo, los puentes de hidrógeno entre los puntos de anclaje y la molécula que se liga a ellos.

Para realizar dicho análisis es premisa obligada la cristalización de la proteína. (Las enzimas solubles se cuentan entre las cristalizables.) La mayoría de las veces se consigue incluir el ligando en un cuerpo sólido o difundirlo posteriormente hasta el lugar de anclaje a través de los canales del disolvente que atraviesan el cristal. Muchas proteínas se mantienen activas en estado cristalino, aunque funcionan con mayor lentitud. Con ello se garantiza que el plegamiento de las cadenas proteicas durante el proceso de cristalización no sufra cambios importantes.

En las proteínas difícilmente cristalizables, la exploración al microscopio electrónico a baja temperatura permite reconocer elementos estructurales por encima de la dimensión del átomo. Mediante técnicas de modelado, que incorporan información relativa a la secuencia de aminoácidos, junto a datos sobre elementos de la estructura secundaria obtenidos por métodos bioquímicos y espectroscópicos, podrán representarse en un futuro detalles moleculares. De entrada sabemos ya, merced a las imágenes del receptor de la acetilcolina obtenidas por microscopía electrónica, que el neurotransmisor sólo encaja en determinada orientación.

Para observar estructuras en solución nos valdremos de la espectroscopía de resonancia nuclear de alta resolución. Exige esta técnica que las moléculas no superen cierto tamaño. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear permite abordar las interacciones dinámicas entre el ligando y la proteína a la que se conjuga, y ello en unas condiciones fisiológicas (temperatura ambiente, solución acuosa). Fúndase esa capacidad en que las señales dependen en parte de las distancias entre átomos, lo que nos faculta, echando mano del método de la geometría de distancias, para reconstruir tridimensionalmente las posiciones de los átomos y explicar así la estructura de las agrupaciones en estudio. Para acometer estos experimentos se requiere todavía una cantidad bastante grande de sustancia.

Una fascinante posibilidad de seguir en directo la termodinámica de la unión entre el ligando y la proteína la ofrece una nueva generación de calorí-

metros, aplicables sobre los puntos de unión, que alcanzan una sensibilidad térmica extraordinaria. Se coloca en un recipiente una cantidad pequeña de la proteína, a la que se añade una cantidad también pequeña del ligando y se va titulando la mezcla. En esta unión se libera un calor que, por la corriente compensatoria necesaria para su eliminación, puede medirse electrónicamente. Se va obteniendo una curva del proceso de la unión a partir de la cual pueden calcularse por aproximación todos los parámetros importantes de la interacción entre el ligando y la proteína. Este método supone un complemento ideal de los escuetos datos estructurales.

Una vez conocida la estructura del lugar de anclaje y las condiciones del acoplamiento, podemos someter a prueba la idoneidad del modelo. Los criterios de validación nos los suministran la biología molecular y la ingeniería genética. Por ejemplo, si basándose en la estructura radiológica de una enzima, en las mediciones calorimétricas y en los cálculos químico-cuánticos se puede deducir que un aminoácido de la bolsa de anclaje resulta decisivo para la interacción con el medicamento, por ingeniería genética puede sustituirse este aminoácido con otro y comprobar la fijeza y la rapidez con que en estas nuevas condiciones tiene lugar la unión. De esta manera se consigue demostrar en la quinasa de timidina vírica, por ejemplo, que la metionina (aminoácido con azufre) sólo ejerce sobre el ligando en el centro activo de la proteína una fuerza de enlace hidrófoba. En efecto, la permutación de la metionina por la isoleucina, que posee una cadena lateral hidrocarbonada puramente hidrofóbica, no repercute negativamente sobre la afinidad.

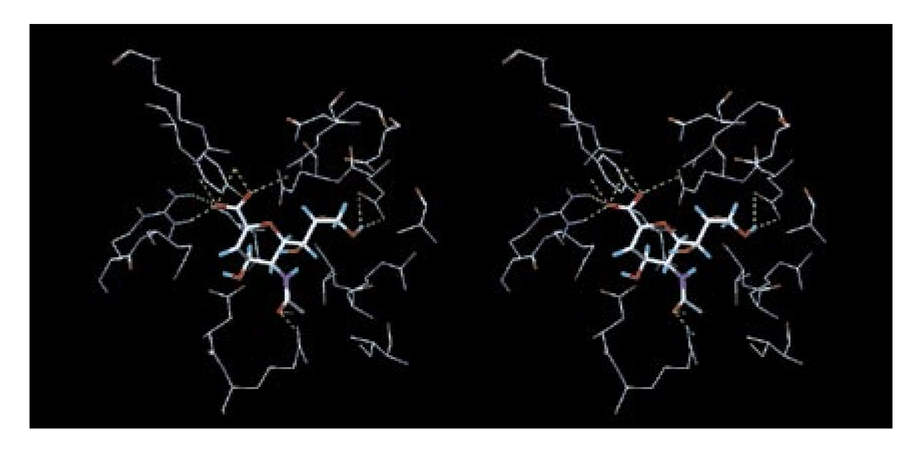
Mediante pruebas funcionales con microorganismos pueden explicarse relaciones complejas que entrañan una importancia mayor. Sírvannos de muestra los receptores acoplados a las proteínas G, que, desde su ubicación en la membrana, transmiten la señal al interior de la célula. Se puede saber qué aminoácidos de la secuencia de las tres proteínas G que hay en la membrana intervienen en el reconocimiento del receptor. Por ingeniería genética se pueden producir muchas combinaciones de proteínas G en células de levaduras o en la bacteria *Escherichia coli* y luego comprobar su capacidad funcional. En animales transgénicos, en los que falta una determinada característica molecular —por ejemplo una parte de una proteína del receptor—, se pueden observar fenómenos todavía más complejos, como son las acciones hormonales y, en particular, las reacciones inmunitarias.

El mosaico de datos obtenidos a partir del análisis estructural, de las investigaciones bioquímicas y de biología molecular, así como de los cálculos mecánico-cuánticos, ofrece finalmente las bases para el modelado molecular. Por tal se entiende la creación por ordenador de un modelo tridimensional, que se puede desplazar interactivamente en todas las direcciones del espacio. Al mismo tiempo, este modelo permite reproducir algunas propiedades de las moléculas: por ejemplo, las características electrónicas del ligando o de cada una de sus sustitutos deducidas a partir de cálculos químico-cuánticos. De esta forma se plasman gráficamente las posibilidades de interacción que pueden tener aminoácidos importantes en el centro activo, calculadas según datos bioquímicos.

Este modelo tridimensional sirve de punto de partida para el diseño estructural de sustancias químicas que se unan a los receptores con mayor intensidad que los ligandos naturales, de suerte que estén en condiciones de desplazarlos. Para ello se puede partir de moléculas conocidas que tengan cierta capacidad de unión y después analizar qué elementos estructurales y qué grupos químicos son los responsables. De estas características se deduce una estructura-patrón a partir de la cual, tras modificaciones y ajustes finos, se intenta conseguir la sustancia óptima.

Otra alternativa es el diseño de ligandos inéditos, sin parecido con ninguna estructura conocida. Se dispone ya de métodos automáticos para este diseño *de novo*. En esta línea, el programa LUDI, desarrollado por Hans-Joachim Böhm y otros, se proponen acoplar pequeñas moléculas al modelo estructural de tal modo que utilicen el máximo número de posibilidades de interacción (*docking*). En la bolsa de enlace pueden también unirse artificialmente ligandos con pequeños elementos de cadenas laterales, sustitutos o grupos funcionales que interaccionen al menos en un punto (*linking*). En ambas alternativas, el programa ha procesado más de 100.000 sustancias con un peso molecular inferior a 500 dalton, cuya estructura queda descrita y archivada en los bancos de datos, lo que facilita y agiliza el diseño *de novo*.

En programas de este tipo resulta decisiva su función crítica; de lo que se trata, en definitiva, es de acertar en una elección entre miles de ligandos con el fin de que sólo una cantidad acreditada pase a la fase de síntesis y ensayo experimental. En el programa LUDI se valoran positivamente, por ejemplo, el número y calidad de las interacciones sobre los puentes de hidrógeno iónicos y neutros, así como sobre las superficies de contacto hidrófobas; por el contrario, el número de enlaces libremente giratorios en los ligandos obtiene una calificación negativa. El calibrado



4. LA BUSQUEDA DE UN FARMACO contra los virus de la gripe se centra en su neuraminidasa. Desde los años setenta se conoce un inhibidor débil de la neuraminidasa, el Neu5Ac2en, fácilmente cristalizable junto con la enzima. A principios de los años noventa se obtuvo el análisis radiológico de la estructura de este complejo, gracias a lo cual se conoció la estructura espacial exacta del lugar de anclaje, representado aquí en un par de imágenes estereoscópicas (*los átomos de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno están señalados respectivamente con los colores blanco, rojo, violeta y azul*). Con estos datos se pueden diseñar inhibidores que se acoplen mejor al receptor.

empírico de los parámetros basado en un gran número de complejos ligandos-proteína garantiza que la función valoradora se aproxime a la realidad.

El papel desempeñado por el diseño de fármacos en la búsqueda de nuevos medicamentos ha sido realmente excepcional en la lucha contra el sida. Con ese fin se han ideado inhibidores de proteasa que frenan la reproducción del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En los laboratorios DuPont/Merck se ha puesto de manifiesto que las ureas cíclicas se adecuan perfectamente a las relaciones simétricas de enlace en el centro activo de la proteasa del VIH. Gracias a estos inhibidores de la proteasa se preparó una triple combinación en la terapéutica del sida que ha conseguido reducir la concentración de virus en la sangre hasta niveles inferiores a los que se puede demostrar en el laboratorio. Se abre con ello una puerta a la esperanza de la sanación.

Otro ejemplo. La protección que ofrecen las vacunas contra las infecciones gripales no perdura porque los virus responsables modifican con rapidez la estructura de sus antígenos (la neuraminidasa y la hemaglutinina) sin que por ello se vea alterada su función. Habría, pues, que encontrar una sustancia dirigida específicamente contra la función que desempeñan las proteínas de la superficie vírica.

La hemaglutinina permite al virus de la gripe adherirse a las células. En este proceso, la proteína se fija a la neuramina al final de las cadenas hidrocarbonadas de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos de la membrana celular, emergiendo de la superficie. Compete a la neuraminidasa cortar los restos glucídicos, de manera que las nuevas partículas víricas al salir de las células infectadas no queden atrapadas. Esta enzima es esencial para muchos microorganismos.

Desde los años 70 se conoce un análogo de la neuramina (Neu5Ac2en) que inhibe débilmente la neuraminidasa y cristaliza con ella. El consiguiente análisis radiológico de la estructura del complejo proteína-ligando nos descubre las características del punto de unión. El estudio exacto del centro activo permite comprobar que contiene un surco que el inhibidor no ocupa. Por tanto, podría dotarse a éste de un grupo químico adicional que se acoplara exactamente a la bolsa.

NEURAMINA

NEURAMINA EN ESTADO DE TRANSICION

ANALOGO DE LA NEURAMINA EN ESTADO DE TRANSICION

4-GUANIDINO-NEU5AC2EN INHIBIDOR DE LA NEURAMINIDASA

BANA 113 INHIBIDOR DE LA NEURAMINIDASA

5. PARA LA ELABORACION de un inhibidor de la neuraminidasa se partió del sustrato natural de esta enzima, la neuramina (Ac = acetato = CO–CH_3). El factor decisivo no fue la forma de la enzima en estado básico, sino la geometría que adopta cuando se halla en estado de transición a la reacción disociativa. La función catalítica de las enzimas descansa en la estabilización de su sustrato en el punto energéticamente más elevado de la cadena reactiva. Pudo diseñarse un análogo de la neuraminida en estado de transición que presentó ya una buena función inhibidora. La eficacia pudo aumentarse en un factor de 10.000 cuando, basándose en un análisis exacto de la bolsa de enlace de la neuraminidasa, se añadió a la molécula un resto guanidínico. Por fin, otros modelos sirvieron de trampolín para saltar a otro tipo de sustancia química más fácilmente sintetizable. Se trata de un derivado del ácido benzoico cuyo anillo hexagonal no es ondulado sino plano. En todo caso, los productos hasta ahora investigados no son tan eficaces como los derivados del ácido neuramínico.

A su búsqueda se consagró cierto grupo investigador australiano. Se sirvió del programa de diseño de fármacos GRID, creado por Peter Goodford en la Universidad de Oxford. Este programa permite recorrer la superficie de una proteína con un grupo químico y encontrar para él un lugar apropiado con el que reaccionar.

En el ejemplo que hemos seleccionado se consiguió una buena interacción con la bolsa de enlace vacía tanto para una unidad amoniacal ($–NH_3^+$) como para una unidad de amidina ($–C(NH_2)_2^+$). Los investigadores sustituyeron en el correspondiente lugar del inhibidor un grupo hidroxilo (–OH) por un resto guanidínico con carga positiva ($–NH–C(NH_2)_2^+$). Obtuvieron un éxito rotundo: la sustancia resultante, 4-guanidino-Neu5Ac2en, conocida luego como Inhibidor Glaxo GG167, demostró una actividad más de 10.000 veces mayor que el compuesto de partida. El análisis radiológico de la estructura de la neuraminidasa del virus de la gripe B con el inhibidor incorporado confirmó el tipo de enlace que, por inferencia teórica, se había propuesto.

Es muy probable que los cambios operados en el centro catalítico influyan en la actividad funcional de la enzima. Se observan especies mutantes que, sustituyendo con glicina uno de los dos ácidos glutámicos responsables de la interactividad con el resto guanidínico, tenían una sensibilidad 200 veces inferior frente al GG167. A pesar de que esta sustitución no repercute substancialmente en la estructura tridimensional del lugar de enlace, el virus resulta afectado de otro modo: la neuraminidasa sólo puede asociarse en ciertas condiciones a las unidades tetraméricas, lo que le es necesario para una buena función.

De acuerdo con la investigación sobre la relación estructura-actividad en derivados de los inhibidores 4-amino y 4-guanidino, la introducción

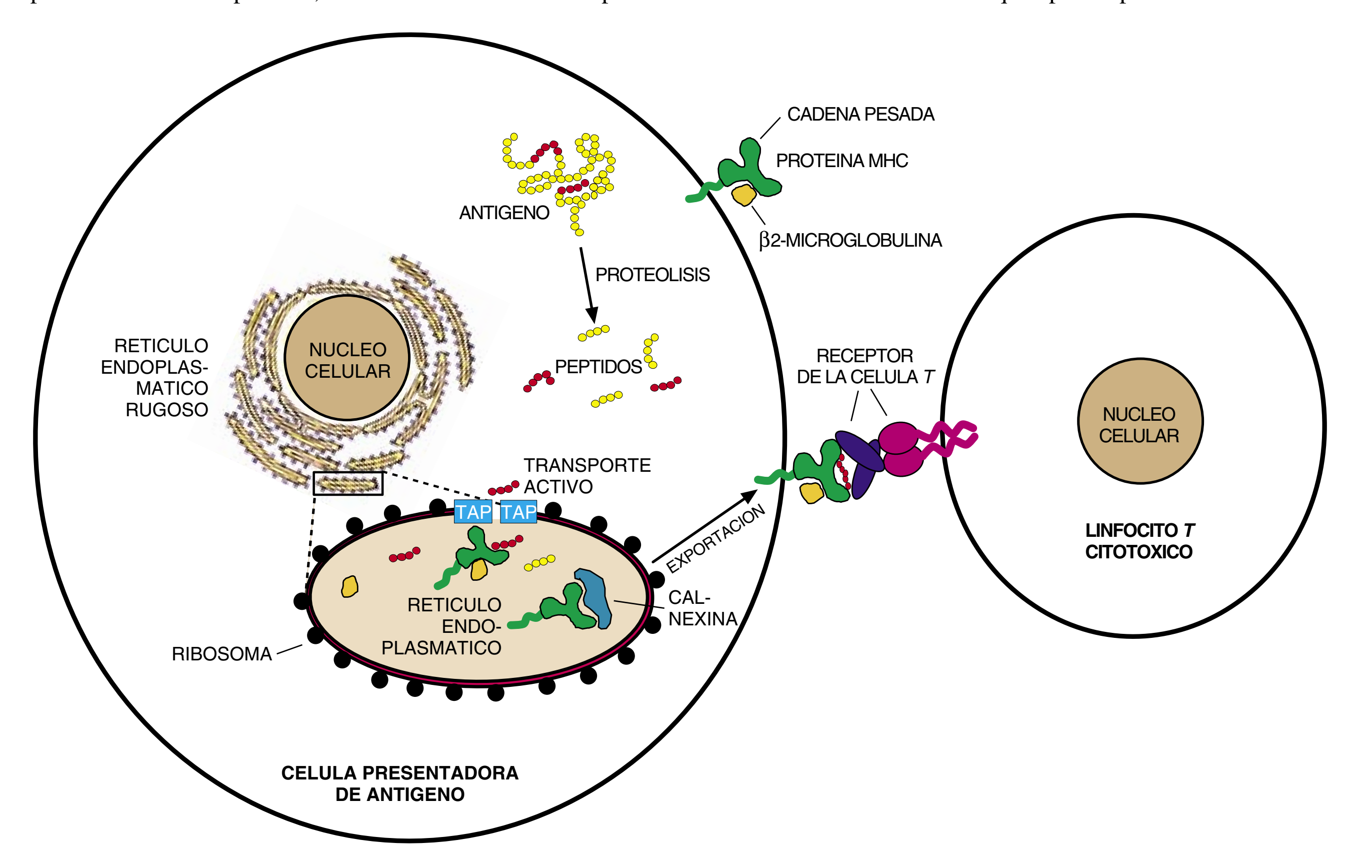
de sustancias que interaccionan con lugares secundarios de enlace mejora la actividad, y sobre todo la selectividad, de los enlaces. Otros modelos posibilitan dar el salto a una clase química de síntesis más accesible. Nos referimos a inhibidores que son derivados relativamente sencillos del ácido benzoico. En cualquier caso no alcanzan todavía la eficacia del GG167.

También en la búsqueda de fármacos contra las enfermedades autoinmunitarias, en que el sistema defensivo humano interpreta erróneamente los tejidos propios tomándolos como extraños y los ataca, se han conseguido ya considerables avances con el diseño de base estructural. En condiciones normales, para que se desencadene una reacción inmunológica es decisivo que las células del organismo infectadas presenten en su superficie, además de fragmentos de sus propias proteínas, péptidos del agente invasor asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Estos complejos de péptidos extraños +MHC son reconocidos por las células *T* asesinas provistas de los receptores adecuados. De esta forma resultan activadas, se multiplican y empiezan a luchar contra las células afectadas.

Aparece una enfermedad autoinmunitaria cuando una proteína del agente causal porta un largo fragmento compartido por una proteína del propio organismo. Si la persona infectada dispone además de moléculas MHC que se acoplan exactamente a este fragmento, configurando un complejo de presentación, no sólo se atacan las células que contienen la proteína extraña, sino también las que presentan la proteína propia del organismo. Incluso después de tener éxito en la defensa frente al agente causal, el sistema inmunitario sigue luchando contra los propios tejidos.

La molécula del MHC, que participa en el reconocimiento erróneo, constituye un objetivo apropiado para la actuación de los fármacos contra las enfermedades autoinmunitarias. La estrategia consiste en desarrollar pseudopéptidos que bloqueen este complejo mediante una unión no reconocible por las células *T*. A este respecto importa que los ligandos se unan específicamente sólo a la molécula MHC afectada y no a la de ningún otro tipo.

En el caso de una enfermedad reumática autoinmunitaria, muy extendida, que afecta a las articulaciones, la llamada artritis espondiliforme, se conocen algunas de las moléculas MHC que participan en el recono-



6. LA RESPUESTA que da la célula *T* del sistema inmunitario depende del reconocimiento molecular. En las células presentadoras del antígeno las proteínas extrañas se disocian bioquímicamente en pequeños fragmentos (péptidos). Un complejo formado por dos proteínas transportadoras (TAP) los introduce en el retículo endoplasmático; en dicha red se ensartan las proteínas a medida que se van sintetizando en los ribosomas. Entre estas proteínas se cuentan también las moléculas presentadoras, o proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las proteínas MHC de la clase I están formadas por una cadena pesada a la que se incorpora una β2-microglobulina. Una vez formadas se unen a la calnexina, con lo cual se impide su salida del retículo endoplasmático. Sin embargo, en el momento en que se presentan ciertos péptidos (*en rojo*) forman con éstos un complejo que se desplaza a la superficie de la célula y permanece allí. Cuando los linfocitos *T* citotóxicos se unen a este complejo de presentación quedan activados, se multiplican y matan a todas las células que contengan el péptido extraño. Puede presentarse una enfermedad autoinmunitaria cuando, por azar, una proteína desencadenante contiene un largo fragmento que coincide con el de una proteína propia del organismo. Si, además, la persona infectada dispone de moléculas MHC, que se unen exactamente con ese fragmento para crear un complejo de presentación, entonces no sólo son atacadas las células que contienen la proteína extraña sino también todas las que produzcan la proteína natural del organismo.

cimiento erróneo. Hace unos años Didier Rognan reconstruyó en el ordenador varios subtipos de MHC y anticipó las condiciones exactas que han de darse para que la molécula ligando se adhiera a la bolsa de enlace. Engarzó varios ligandos potenciales en la bolsa de enlace (*docking*); se trataba de péptidos naturales y sustancias proteicas que contenían aminoácidos no presentes en la naturaleza. Se sirvió, para esos prototipos informáticos, del programa GRID y de otras simulaciones ampliadas de la dinámica molecular de todo el complejo en medio acuoso, llegando a incluir en el modelo más de mil moléculas de agua. Con estas simulaciones Rognan buscaba, sobre todo, investigar la movilidad y la exposición a los solventes de cada uno de los grupos químicos del ligando y de los correspondientes puntos de enlace en la proteína receptora. Todo ello no sólo demuestra hasta qué punto importa el contacto entre las dos partes que interaccionan, sino que permite también extraer ciertas conclusiones sobre la afinidad. Un año más tarde, el análisis estructural por rayos X del mismo subtipo demostró la exactitud del diseño confirmando todas las características estructurales predichas y el *docking*.

De las simulaciones se deduce que, en un péptido de nueve aminoácidos, sólo el segundo, el tercero y el noveno son esenciales para el enlace. En consecuencia, los demás aminoácidos deben servir de mediadores en la colocación del receptor de la célula *T* o no intervienen en el reconocimiento del antígeno. En las simulaciones por ordenador se demuestra, además, que la afinidad de los ligandos se centuplica cuando en la posición 3 hay un aminoácido no natural con un resto naftílico. Por otro lado, puede sustituirse toda la parte central de la sustancia ligando por análogos carbohidratados que no permiten el reconocimiento de las células *T* sin que por ello se pierda la afinidad.

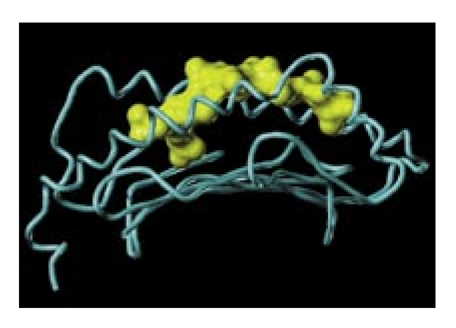
Se trataba de interrumpir sólo el reconocimiento del subtipo del receptor de la célula *T* corresponsable del desencadenamiento de la enfermedad. El ligando encontrado todavía no era capaz de hacer esta diferenciación. El dato decisivo para seguir perfeccionándolo lo proporcionó la demostración biológico-molecular de que la sustitución del aminoácido fenólico tirosina en posición 59 de la molécula de MHC por la histidina bastaba para eliminar la sensibilidad ante la artritis espondiliforme. Sin embargo, esta mutación altera las condiciones de enlace para las sustancias ligandos peptídicas en posición 1.

Mediante el modelado y su posterior diseño estructural puede crearse un péptido que distinga los dos subtipos. Su particularidad consiste en tener un aminoácido β en posición 1. No quiere decir que tengamos con ello entonces un medicamento. Antes hay que comprobar que las concentraciones necesarias se alcanzan no sólo en el tubo de ensayo sino también en el organismo. En cualquier caso el éxito descrito demuestra el grado de calidad a que se ha llegado en el diseño racional de fármacos.

Otro ejemplo impresionante lo tenemos en la búsqueda de sustancias que se oponen a la coagulación de la sangre. En ese proceso fisiológico se suceden una serie de complejas reacciones en cascada en la que en cada fase se genera, a partir de un precursor enzimático inactivo, una enzima que activa la fase siguiente. Al final de la cascada la trombina actúa sobre el fibrinógeno soluble para dar fibrina, que adopta la forma de una malla donde quedan atrapadas las plaquetas y los hematíes que se aglutinan formando un tapón. Lo que en una herida constituye un proceso valioso para detener la pérdida de sangre, deviene peligroso cuando se trata de un infarto, de un ictus cerebral o de una trombosis. De lo que se trata entonces es de frenar la tendencia a la coagulación, que se ha intensificado.

Podría empezarse por bloquear la enzima trombina. Mosquitos, chinches, sanguijuelas y otros chupadores de sangre disponen en su saliva de inhibidores de la trombina que impiden que la sangre que toman se coagule durante la absorción o en los órganos de succión. Tales bloqueantes son péptidos de cierto tamaño.

El estudio del punto de la molécula de fibrinógeno donde se produce su escisión y el análisis de su interacción con la trombina condujeron a grandes éxitos. El segmento afectado del fibrinógeno tiene la secuencia Gli-Gli-Val-Arg-Gli, y el punto de escisión está situado entre la arginina (Arg) y la glicina (Gli). La cadena lateral de la arginina, fuertemente alcalina y con una permanente carga positiva, emerge de la bolsa de especificidad de la trombina, donde toma contacto con el grupo carboxilo de un aspartato que tiene carga negativa para iniciar una interactividad muy estable. Por el contrario, la cadena lateral lipofílica de la valina (Val) tiene una bolsa hidrófoba. Recabados estos datos, se sintetizaron muy pronto análogos inhibidores de la trombina.



7. BOLSA DE ENLACE de un subtipo de MHC de la clase I (*líneas azules*) tal y como participa en la instauración de una enfermedad autoinmunitaria de las articulaciones muy difundida (artritis espondiliforme), con el antígeno ligando peptídico empotrado (*amarillo*). Basándose en análisis estructurales y en modelos creados en el ordenador pueden desarrollarse pseudopéptidos que bloqueen la proteína MHC al formar con ella un complejo no reconocible por las células *T*.

Mostró particular eficacia la secuencia D-Phe-Pro-Arg. Esta estructura primaria, que contiene una D-fenilalanina (D-Phe), imagen especular de la forma L natural, delante de una prolina (Pro), ha servido de punto de arranque, en distintos laboratorios, para diversos inhibidores de la trombina. Salvo en los laboratorios Merck. Partieron éstos de una sustancia natural encontrada en *Theonella*. Esta esponja marina contiene un péptido cíclico pequeño cuya estructura exacta se descubrió en 1990. Los componentes fundamentales son una arginina (Arg) y un grupo dicetónico (–CO–CO–) del que se sabe que, situado en la posición adecuada, puede acoplarse a la serina catalíticamente activa de la trombina para formar un enlace covalente reversible. La incorporación de este elemento estructural en el tripéptido D-Phe-Pro-Lys engendra un potente inhibidor, aunque de escasa especificidad: además de la trombina inhibe también la tripsina, enzima digestiva con una estructura parecida.

La especificidad puede reforzarse, sin apenas mermar la eficacia, sustituyendo la cadena lateral de la lisina por una ciclohexilamina (C_6H_{11}–NH_2). La razón es que el anillo ciclohexílico (C_6H_{11}) ejerce una interacción hidrófoba con un grupo metílico de la alanina en la bolsa de enlace de la trombina, mientras que la serina

colocada en el correspondiente lugar de la tripsina tiene vedada dicha interacción. Además, los químicos de Merck eliminaron el grupo de enlace covalente CO–CO, pues los enlaces covalentes entre el sustrato y la sustancia activa resultan perjudiciales.

Dado el bajo peso molecular de esta sustancia, reducida en su tamaño de la forma descrita y con una afinidad del mismo orden que la de la estructura básica original, debe tener una buena biodisponibilidad. Para seguir mejorando su rendimiento se introdujo el nuevo método de la química combinatoria. Sustituyendo a la D-fenilalanina se insertaron en la molécula 200 ácidos carboxílicos, elegidos por parecer los más apropiados entre unos 8000. Todo ello se llevó a cabo, comprobaciones incluidas, en un plazo de sólo tres meses.

Las inversiones y la paciencia de los investigadores de Merck valieron la pena. La elección de una sustancia natural como estructura básica, sumada al diseño estructural y a la química combinatoria, produjo una sustancia de bajo peso molecular, eficacísima y de fácil elaboración, pues consta de un grupo básico y un centro quiral de la L-prolina natural, nada más. En la rata esta sustancia sólo es biodisponible en un 6 %, pero en el perro lo es aproximadamente en un 75 %, el valor más alto conseguido hasta el presente para un inhibidor de la trombina.

Combinando diversos métodos se ha obtenido un inhibidor de las endotelinas, péptidos naturales de 21 aminoácidos. Se descubrieron en 1988. Actúan como vasoconstrictores, y en consecuencia como hipertensores, con una potencia diez veces superior a la de las hormonas angiotensina II, vasopresina o noradrenalina. En concentraciones elevadas la acción vasoconstrictora puede ser tan potente que dañen riñones y otros órganos por insuficiente irrigación.

Las endotelinas operan sobre dos receptores diferentes, ET_A y ET_B. Los fármacos pueden actuar sobre la enzima o sobre el receptor. Pero desconocemos la estructura espacial de los receptores ET y carecemos de un modelo de la zona de enlace; eso significa que está descartado un procesamiento basado en la estructura. En fechas recientes algunos laboratorios, con ayuda de receptores ET_A y ET_B humanos preparados por ingeniería genética, han rastreado en sus archivos en busca de posibles antagonistas. Entre las decenas de miles de enlaces ensayados en los laboratorios BASF se encontró una sustancia que, en principio, debía utilizarse como producto vigorizador de las plantas. Más tarde se comprobó que no cumplía los requisitos para ello. Esta sustancia no sólo ejercía un efecto bastante potente, sino que además mostraba una preferencia por el receptor ET_A frente al ET_B, presentando así la tan deseada selectividad. De estructura un tanto compleja, constaba de dos centros quirales. Así pues, se emprendieron trabajos para conseguir simplificar paso a paso la molécula sin que perdiera su eficacia y, sobre todo, su selectividad. El resultado fue una sustancia que no sólo se unía al receptor ET_A con una fuerza 40 veces mayor que el producto original para las plantas, sino que presentaba además una notable selectividad respecto al receptor ET_B.

Por una afortunada casualidad terminó por entrar en juego el modelado molecular. Fue cuando los laboratorios SmithKline Beecham informaron de otro antagonista de los receptores ET. A pesar de que la sustancia difería de la elaborada por BASF se adivinaba cierta correspondencia entre los elementos de una y otra. Superponiendo ambas estructuras se llegó a la conclusión de que la afinidad por el receptor puede reforzarse mediante la agregación de grupos adicionales. Se sintetizaron algunas variantes y una de ellas demostró ser 15 veces más activa con la misma selectividad.

Aquí la estructura básica se obtuvo a partir de un producto para las plantas, el procesamiento químico aconteció de la forma clásica y el broche final lo puso el modelado comparativo con un producto de la competencia.

La investigación farmacológica que veremos se caracterizará por una técnica integradora. Lo observamos ya en la tendencia a aunar los resultados del modelado molecular, la espectroscopía de resonancia nuclear, el análisis radiológico de las estructuras y la química combinatoria. Cumplirá un papel muy importante a la informática, en su avance vertiginoso. Sólo los ordenadores de alto rendimiento están capacitados para dirigir complicados instrumentos analíticos de medida y procesar y analizar cantidades ingentes de datos.

En determinados laboratorios bien pertrechados, la química combinatoria se ensamblará con la modelización molecular. Amedeo Caflisch y Martin Karplus han ideado un modelo informático en el que la acetamida, el benzol y el dietiléter recorran la superficie de la bolsa de enlace de una estructura proteica. Las propiedades de enlace de estas moléculas sencillas podrían ser sustitutos de un ligando de macromolécula. En la medida en que una de estas moléculas interacciona fuertemente en un punto de la bolsa de enlace queda allí anclada; en la simulación de la dinámica molecular a altas temperaturas, este atrapamiento dura más que el de otras moléculas. Así, un núcleo benzólico se adapta perfectamente a un nicho formado por aminoácidos aromáticos e hidrófobos, mientras que una acetamida permanecerá fijada allí donde se den las condiciones óptimas para for-

8. ESTE FRAGMENTO de la bolsa de enlace de una proteína MHC en el que aparecen las cadenas laterales de sus aminoácidos (*blanco por carbono, rojo por oxígeno, amarillo por azufre*), muestra la zona responsable del enlace de los aminoácidos en posición 1 y 2 del péptido antigénico (*cadenas carbonadas representadas en naranja*). Si la tirosina, situada arriba a la izquierda, es sustituida por la histamina (*verde*) se obtiene un subtipo MHC diferente.

mar simultáneamente varios puentes de hidrógeno.

Basándose en estos experimentos *in silicio* se puede hacer una clasificación de los posibles sustitutos para acoplarse a las bolsas de enlace. Estos sustitutos están constituidos por pequeñas moléculas; cada una de ellas se acopla con sus características propias. Lo único que se necesita además es que se enlacen químicamente en el orden adecuado. El resultado es una estructura básica que puede ir perfeccionándose paulatinamente. El análisis puede combinarse también con una búsqueda en la base de datos. Los algoritmos para el muestreo dirigido en estos archivos (*database mining*) permiten comparar las pequeñas moléculas, situadas en su posición relativa en la bolsa de enlace, con los miles de estructuras sintéticas que figuran en la base de datos hasta descubrir las que satisfagan un criterio de semejanza.

Dagmar Ringe y Gregory A. Petsko cristalizaron la elastasa con etanol, acetonitrilo, benzol y siete disolventes más. Sometieron a análisis radiológico la estructura de los cristales de proteína y comprobaron dónde se habían enlazado las moléculas del disolvente. Al cabo de pocos días se ponían de manifiesto los puntos de anclaje preferidos por estas moléculas. Y, con ello, cartografiaron las características de enlace en la superficie de la proteína diana.

Un resultado semejante se apuntó el equipo de Stephen W. Fesik. Este se apoyó en un método de resonancia nuclear que bautizaron con el nombre de “SAR by NMR” (“Relación estructura-actividad mediante resonancia magnética nuclear”). Con la moderna espectroscopía pluridimensional heteronuclear de correlación se puede estudiar el enlace molecular de los ligandos a proteínas en las que los átomos de nitrógeno se han sustituido parcialmente por el isótopo pesado ^{15}N para convertirlo luego en sonda. A partir del espectro se puede saber en qué punto se fija preferentemente cada ligando. Con los métodos del modelado y de la química combinatoria se pueden construir estructuras patrón que se irían refinando poco a poco. Así se llega al diseño de un ligando de alta afinidad para la molécula inmunosupresora FK506.

Este método permite elaborar estructuras patrón que interaccionan en diversos puntos con la bolsa de enlace. Al tener ésta ocupada se garantiza una elevada afinidad y selectividad. Se evita con ello la dificultad que presenta el diseño de base estructural. Si el ligando es menor que la bolsa de enlace, la forma en que se produce el anclaje no tiene por qué ser única. Como demuestra el estudio radiológico de algunas estructuras de los complejos ligando-proteína, a menudo un ligando poco rígido se acopla a la bolsa de enlace de un modo inesperado. Por esta razón los grupos bloqueantes no suponen siempre el obstáculo previsto: la molécula del ligando se va adaptando a la vez. En estos casos se habla de enlace alternativo o múltiple.

Mientras que los métodos descritos hasta ahora se basan en la caracterización empírica de las propiedades de los ligandos y de las moléculas diana, la teoría de la densidad funcional introduce *ab initio* cálculos mecánico-cuánticos para el diseño de ligandos. Estos cálculos permiten deducir, por ejemplo, que el centro activo de una quinasa vírica (enzima que cataliza el paso de un resto fosfato a una proteína) debe estabilizar los nucleósidos. Basándose en cálculos mecánico-cuánticos se encontró incluso una nueva clase de enlaces que algún día podrían servir para el tratamiento de infecciones víricas.

Baste este manojo de ejemplos para ponderar la diversidad y eficacia de los métodos del diseño de fármacos.

a

CH_3 COOH OCH_3 O N N O N OCH_3

OPTIMIZACION QUIMICA DE LA ESTRUCTURA

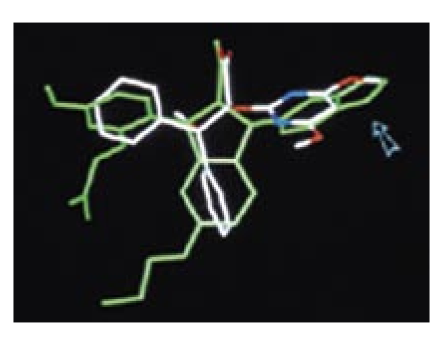
b

COOH OCH_3 H_3CO N O N OCH_3

COMPARACION CON LA ESTRUCTURA ESPACIAL DE OTRO INHIBIDOR DEL RECEPTOR ET_A

c

COOH OCH_3 H_3CO N O N



9. LAS ENDOTELINAS son péptidos vasoconstrictores propios del organismo; desarrollan su acción ligándose a dos receptores, ET_A y ET_B. Buscando en el archivo de sustancias de la firma BASF un posible antagonista para el receptor ET_A se encontró un compuesto que en un principio había de utilizarse como agente protector de plantas, pero que no cumplía todas las condiciones para ello (*a*). Mediante una transformación química se convirtió en una sustancia fácilmente sintetizable que se unía todavía con más fuerza al receptor ET_A (*b*). Cuando los laboratorios Smith Kline Beecham presentaron un antagonista propio, la superposición de este compuesto (*en verde*) con la sustancia de la BASF (*en blanco*) abrió una serie de posibilidades para mejorarlo. La afinidad por el receptor aumenta si en lugar del grupo metoxi (–OCH_3) se introduce una estructura lipofílica de mayor tamaño (*en rojo*). En la práctica, la aplicación de un compuesto así preparado (*c*) demostró una eficacia 15 veces superior.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

MOLECULAR MODELING. BASIC PRINCIPLES AND APPLICATIONS. H.-D. Höltje, G. Folkers, en *Methods and Principles in Medical Chemistry*, vol. 5, VCH, Weinheim 1996.

A TEXTBOOK OF DRUG DESIGN AND DEVELOPMENT. Dirigido por P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors y U. Madsen. Segunda edición. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1996.

THE PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY. Dirigido por C. G. Wermuth. Academic Press, Londres 1966.

Del laboratorio a la planta industrial

Entre el descubrimiento de una sustancia de interés farmacológico y su producción industrial hay un largo camino por recorrer. El aumento de escala de la reacción exige un profundo conocimiento de la materia

Georg Arnold Krei y Ernst Buschmann

A finales de los años ochenta, el grupo dirigido por George Pettit, de la Universidad estatal de Arizona en Temple, encontraron en el caracol marino *Dolabella auricularia* una nueva clase de sustancias naturales potencialmente anticancerígenas. Hasta 1,6 toneladas de esos gasterópodos se recogieron en el océano Indico. Las sustancias extraídas se separaron en 20.000 fracciones, que se sometieron a pruebas de eficacia farmacológica. Se descubrieron ciertas moléculas que inhibían la división celular, y las llamaron dolastatinas. En varios modelos animales se comprobó que las dolastatinas 10 y 15 ejercían una intensa actividad citostática.

En sólo seis meses, los químicos del laboratorio central de BASF en Ludwigshafen sintetizaron moléculas de estructura parecida, que mostraron una actividad citostática más intensa que la operada por las dolastatinas naturales. Se contaba entre esas moléculas el pentapéptido LU 103793 y otros dos compuestos similares. Tras la obtención de la patente, y a fin de lograr un fármaco apto para el mercado, había que proceder a su síntesis con la mayor celeridad posible. Si consideramos que la protección de la patente cubre sólo 20 años, el tiempo que se dedique al desarrollo significará una pérdida inevitable de mercado ante la competencia. Para un fármaco de tipo medio, las pérdidas de un mes de demora se cifran en torno a los 1300 millones de pesetas.

GEORG ARNOLD KREI y ERNST BUSCHMANN trabajan en la empresa BASF AG de Ludwigshafen. Krei, doctor en ingeniería de procesos, es especialista en cinética de reacciones y equilibrios de fases. Buschmann, químico de formación, dirige el desarrollo técnico de fármacos en el laboratorio central de Ludwigshafen.

Planificación de la síntesis química

Al principio del desarrollo de un fármaco, la síntesis debe proporcionar cantidad suficiente de substancia para realizar los ensayos toxicológicos, farmacológicos y galénicos obligados. En un segundo paso se procede a la investigación clínica. Suele necesitarse unos 10 kilos de substancia para llegar a la fase clínica.

Pero los métodos de síntesis que caracterizan el trabajo de laboratorio no sirven para cargas de 10 kilos. Propio del laboratorio es preparar, en el menor tiempo posible, cantidades de substancia del orden de miligramos. Con los 50.000 reactivos que habrá en el mercado, el químico consigue rendimientos moderados, del 40 al 60 % por paso. Muchos de estos reactivos son caros; de otros se dispone sólo en cantidades pequeñas, del orden del gramo. En su laboratorio, el químico se preocupa poco de las condiciones de reacción y elige los reactivos sin pensar en sus posibilidades de aplicación industrial ulterior.

Dicho de otro modo: para operar en planta piloto hay que diseñar un método de síntesis nuevo. Este nuevo procedimiento deberá parecerse al máximo al seguido en el laboratorio. Si se produjeran cambios fundamentales podrían darse impurezas en el fármaco y, por tanto, exigir una nueva investigación toxicológica, lo que acarrearía mayor pérdida de tiempo.

En la planificación de la síntesis nos vemos condicionados por la disponibilidad de los productos de partida. Que alcancen masa de kilos habrá en el mercado unas 5000 substancias. Para localizarlas puede acudirse a bancos de datos; dos directorios famosos son el de la empresa MDL Information Systems, de Colonia, y el de la compañía Chemical Information Services, de Dallas. Si el producto de partida no está a la venta, habrá de preparárselo uno mismo.

Fijémonos, por ejemplo, en la dehidroprolina, un aminoácido no natural que constituye la materia prima de la preparación de varios compuestos. El método de síntesis de laboratorio se mostró inoperante al aumentar la escala; desde el punto de vista industrial carece de interés, pues origina dos productos secundarios gaseosos de mal olor y tóxicos. Para la planificación de la síntesis de moléculas sencillas puede recurrirse a programas de ordenador; entre los más conocidos, el REACCS (sistema de acceso a reacciones) y del CASP (diseño de síntesis asistido por ordenador). En nuestro ejemplo de la dehidroprolina la búsqueda suministró unas 400 propuestas. Experimentos orientativos demostraron que todas eran inviables. Por ello decidimos seguir un método por el que, a través de un derivado poco frecuente de selenio, se obtienen kilogramos del aminoácido deseado.

El problema fundamental en la preparación de LU 103793 consiste en averiguar qué secuencia de unión entre los cinco aminoácidos es la más favorable. Hay 14 posibilidades; ocho de ellas corresponden a métodos lineales, es decir, a la inserción de un

aminoácido en la cadena creciente del péptido, en cada paso. Pero los seis métodos convergentes proporcionan un mayor rendimiento final. En el procedimiento convergente se obtienen bloques de 2 y 3 aminoácidos, que se unen para formar el pentapéptido. Suponiendo los mismos rendimientos en todos los pasos (cuatro uniones entre aminoácidos), el rendimiento total de los métodos convergentes supera el de los lineales.

En el tercer paso de la síntesis de laboratorio se engarzaron los dipéptidos dimetilvalina-valina y metilvalina-prolina. Sin resultado satisfactorio. Además, apareció racemización parcial (transformación parcial de un L-aminoácido en su D-aminoácido), el reactivo era muy caro y no podía disponerse del mismo en cuantía suficiente. Se abandonó ese método de síntesis. Pero la falta de tiempo desaconsejaba investigar de forma sistemática las 13 posibilidades restantes. Tampoco cabía pensar en el auxilio del computador para un problema de tamaña complejidad. Para elegir el camino adecuado hubo que entregarse a la experiencia e intuición del químico.

Al principio se optó por la síntesis vía el tetrapéptido dimetilvalina-valina-metilvalina-prolina; se trataba de un tetrapéptido que podía emplearse también en la síntesis de otros dos productos anticancerígenos. Sin embargo, más tarde se vieron las ventajas que presentaba otra secuencia de unión, que partía de N-prolilbenzamida y ofrecía un mayor rendimiento.

En la planificación de la síntesis de fármacos reviste particular importancia la presencia de varios centros de quiralidad (del griego *cheir*, mano): un 80 % de ellos contiene uno o más centros quirales. Se trata de zonas de la estructura que forman imágenes especulares no superponibles (enantiómeros), a la manera de la mano derecha y la izquierda. La difusión del fármaco a través de las membranas biológicas, su interacción con un receptor o la inhibición de una enzima dependen de sus formas tridimensionales (estabilidades de las uniones y velocidades de interacción), puesto que receptores, enzimas y membranas son quirales. En el organismo, la acción de cada enantiómero de un compuesto quiral puede diferir bastante de la ejercida por otro en lo concerniente a actividad biológica, toxicidad, biodisponibilidad y metabolismo. De ahí que resulte aconsejable la obtención por separado de enantiómeros puros de un fármaco.

Podemos partir de productos quirales (aminoácidos naturales, azúcares o terpenos), que nos permitan preparar directamente las formas de estructura espacial deseada. En el proceso industrial, no obstante, se sintetiza primero la mezcla de isómeros (mezcla racémica) y luego se separa la forma deseada, en la mayoría de los casos por cristalización selectiva. Cierto es que así se pierde la mitad del material sintetizado. Pero en algunos casos se puede transformar el isómero no utilizable en la mezcla racémica, para volver a separar el isómero deseado. Las substancias empleadas en la separación de un



DOLASTATINA 10

DOLASTATINA 15

LU 103793

1. DEL CARACOL MARINO *Dolabella auricularia* se aislaron péptidos que presentaban actividad inhibidora de tumores (actividad citostática). Entre los péptidos había dolastatinas 10 y 15. La substancia que lleva el nombre provisional de LU 103793 es un producto sintético que pertenece a la misma clase de compuestos, si bien desarrolla una actividad inhibidora de tumores mayor que la de las dolastatinas naturales. Los autores han elegido esta molécula para debatir los problemas que plantea el aumento de escala en la síntesis de fármacos.

N-DIMETILVALINA VALINA N-METILVALINA PROLINA BENCILAMIDA DE LA PROLINA

SINTESIS LINEALES	**1.**	**2.**	**3.**	**4.**	**A**
	4.	**1.**	**2.**	**3.**	**B**
	4.	**3.**	**1.**	**2.**	**C**
	4.	**3.**	**2.**	**1.**	**D**
	2.	**1.**	**3.**	**4.**	**E**
	3.	**2.**	**1.**	**4.**	**F**
	3.	**1.**	**2.**	**4.**	**G**
	4.	**2.**	**1.**	**3.**	**H**
SISTESIS CONVERGENTES	**1.**	**2.**	**4.**	**3.**	**I**
	2.	**1.**	**4.**	**3.**	**J**
	3.	**4.**	**1.**	**2.**	**K**
	3.	**4.**	**2.**	**1.**	**L**
	1.	**3.**	**2.**	**4.**	**M**
	4.	**1.**	**3.**	**2.**	**N**

2. EN EL DISEÑO DE LA ESTRATEGIA DE SINTESIS INDUSTRIAL del pentapéptido LU 103793, detectar cuál es la secuencia más favorable para unir los cinco aminoácidos no es un problema trivial. Hay 14 posibilidades en principio: 8 lineales (engarzar los aminoácidos uno a uno en la cadena creciente del péptido) y 6 convergentes (formar bloques de 2 y 3 aminoácidos y juntarlos para obtener el pentapéptido). En teoría, el rendimiento de la síntesis convergente supera el alcanzado con la síntesis lineal. Mas, llegados a la fabricación industrial, la variante lineal D demostró ser la mejor. En el laboratorio la substancia se había sintetizado según el método M.

racemato son caras y difíciles de recuperar. Por ello es preferible recurrir a métodos de síntesis selectivos, cuando existen. A propósito de la preparación de moléculas quirales, hemos de mencionar las reacciones químicas en que intervienen enzimas o microorganismos.

En otro orden, recuérdese que, de cada fármaco, acostumbran fabricarse unas cuantas toneladas anuales. Quiere ello decir que no es rentable la construcción de una planta industrial para cada producto. Antes bien, se recurre a instalaciones de uso múltiple, basadas en reactores de agitación equipados para reacciones térmicas. Para casos especiales existen reactores que permiten efectuar reacciones fotoquímicas (reacciones fotoiniciadas), oxidaciones electrolíticas o pirólisis a altas temperaturas (descomposición).

Aumento de escala de los pasos de síntesis

Para el péptido LU 103793, del tipo de la dolastatina, se planeó una estrategia de síntesis de más de 10 pasos. Se disponía de sólo seis meses para optimizar a escala técnica cada paso, incluidos los métodos de aislamiento de productos intermedios, de productos secundarios y de residuos, así como la preparación de un lote de 10 kilos. Mientras tanto, el departamento de farmacología elegiría, entre los tres posibles, el candidato idóneo. Transcurrido ese intervalo temporal, habría que ofrecer cantidad suficiente del fármaco elegido.

La optimización de las reacciones, la separación y el aislamiento de los productos se investigan a escala de laboratorio, para ahorrar tiempo y dinero. En lo concerniente a rendimiento, selectividad, calidad, seguridad y protección del medio, debe procederse tomando en consideración la posterior aplicación a escala industrial de cada paso.

Las pruebas se realizaron primero en matraz de 100 ml. En el propio laboratorio se aumentó la escala a recipientes de vidrio de uno a cuatro litros de capacidad y de geometría similar a la de un reactor típico de producción. Se pasó después a instalaciones fabriles de multiuso: reactores con capacidad de 100 a 4000 litros, de acero inoxidable o forrados de esmalte, según las exigencias.

Para tal procedimiento, el de pasar de una escala a una siguiente mayor, se ha acuñado la expresión “scale-up” (aumento de escala). Con mayor razón podría también hablarse de “scale-down” (reducción de escala); en efecto, la velocidad de la adición, del calentamiento y enfriamiento, los puntos extremos de temperatura y otras variables adicionales del proceso industrial se investigan primero a una escala inferior a la que se realizará la síntesis comercial. El ensayo de prueba a escala industrial siempre revela fenómenos inesperados y a veces trae sorpresas. No es raro que se tenga que volver a los ensayos de laboratorio para su ulterior refinamiento.

Pero, ¿cuáles son los problemas habituales que acompañan al incremento de escala de una síntesis? El porcentaje de conversión y su selectividad vienen determinados por la superposición de dos efectos: el de la microcinética de la reacción (velocidad de la reacción a escala molecular) y el de los procesos físicos implicados (transporte de materia y calor). Allí donde se desarrolla la reacción se consumen las substancias de partida, se forman los productos de reacción y el calor que se libera provoca un aumento de temperatura. De ello se infiere que pueden surgir desequilibrios locales (sobre todo si la velocidad de reacción aumenta con la temperatura). La convección y la difusión —procesos de transporte— ejercen un efecto amortiguador sobre la formación de puntos de irregularidad. Pero los procesos de transporte son, a su vez, función del volumen. Pensemos en la disolución de un sólido seguida por su reacción en solución: si la velocidad de la reacción en solución es mucho más alta que la de disolución, a buen seguro las reacciones de laboratorio diferirán de las que ocurran en fábrica.

Por consiguiente, en el inicio del proceso quedará establecida la sensibilidad del procedimiento ante el cambio de determinados parámetros físicos. Deberán evitarse los parámetros que perjudiquen la síntesis industrial, identificarse los parámetros que cuestionen la reacción a escala técnica y perfilar los valores de compromiso en el aumento de escala. Conviene estudiar la forma en que las modificaciones del proceso de síntesis reducen la dependencia de tales parámetros físicos.

Acostumbra haber en los laboratorios de ensayos reactores especiales que son similares en muchos aspectos a los de las plantas industriales. Disponen, por ejemplo, de un sistema segmentado de calefacción o de enfriamiento que permite simular el perfil de calentamiento o enfriamiento de los reactores de planta. En estas tareas prestan valiosa ayuda los métodos analíticos modernos. La espectroscopía infrarrojo “en línea” permite el seguimiento de la reac-

ción y una interpretación directa y rápida de los resultados. Mediante la asignación inmediata de las bandas de absorción en el infrarrojo de los compuestos orgánicos a distintos grupos de moléculas, podemos seguir la formación o desaparición de las correspondientes moléculas.

Si una reacción es muy sensible a los procesos físicos, deberá desarrollarse una variante sintética menos sensible o buscar la solución en la remodelación y uso de instalaciones especiales. En el peor de los casos se realizará la síntesis utilizando un elevado número de reactores pequeños. Veamos algunos ejemplos con las soluciones aportadas.

Reacciones problemáticas en planta

Un problema diario es el aumen to de escala en reacciones exotérmicas o endotérmicas (las acompañadas de producción o absorción de calor). La capacidad de transmisión térmica a través de las paredes del reactor determina la velocidad máxima de la reacción. Al aumentar el diámetro del reactor, disminuye la razón de superficie externa a volumen y, con ello, disminuye la capacidad de intercambio de calor. La reacción ha de proceder con mayor parsimonia y se tarda más en la conversión completa de la carga. Así ocurrió con el efecto que se observó en la preparación de un precursor del Captopril (fármaco para rebajar la presión arterial). Entre 0 y 5 ºC se hace reaccionar prolina con un cloruro de ácido en presencia de sosa, con producción de prolina acilada y cloruro sódico. Acabada la reacción se acidifica a *p*H 2 y la substancia precipita en forma cristalina. La reacción es muy exotérmica. En el laboratorio, el producto es de alta pureza, el rendimiento, óptimo y el tiempo invertido en la reacción, una hora. En planta, la reacción requiere de 6 a 10 horas. Al acidificar, obligados por un aumento notable de la viscosidad del sistema, el producto tarda en precipitar. Hay que inducir la cristalización agitando fuertemente con un finísimo control simultáneo del *p*H y la temperatura. A pesar de todas las precauciones, el producto precipita en forma de grumos de 5 cm de longitud. La pureza es alta pero los rendimientos son inaceptables.

El aumento del tiempo de reacción favorece la aparición de productos secundarios, que se interponen en el proceso de cristalización. La solución vino con la instalación de un circuito adicional de refrigeración interna. Aumentaba así la capacidad de transporte de calor del sistema y, por ende, se redujo el tiempo necesario para la reacción.

En el ámbito de las operaciones de aumento de escala, las reacciones que implican más de una fase son críticas. En ellas la velocidad de reacción viene determinada por el transporte de materia entre fases; por ejemplo, entre una fase líquida y una sólida o gaseosa (fases son zonas macroscópicas homogéneas). Un problema

3. EN EL LABORATORIO (escala de gramos) se obtiene el metil éster de la dehidroprolina a través de la eliminación de Chugaev vía un intermedio xantogenato (*cuadro superior*); como productos secundarios se forman oxisulfuro de carbono (COS) y metilmercaptano (CH_3SH). Estos dos compuestos son gases tóxicos y de mal olor, lo que torna inviable la síntesis a escala industrial. En la preparación de dehidroprolina y otros compuestos sencillos podemos servirnos de programas de síntesis asistida por ordenador: REACCS o CASP. En esta síntesis los programas propusieron 400 alternativas (*una muestra de ellas en el cuadro central*). En la síntesis industrial (escala de kilos) el método descrito en el cuadro inferior, que utiliza un derivado de selenio poco corriente, proporcionó una buena selectividad y rendimientos satisfactorios.





4. EL REACTOR de la izquierda, con una capacidad de sólo 4 litros, imita la geometría de un reactor industrial. Ello nos permite abordar el efecto de la variación de parámetros y condiciones del proceso; nos referimos, por ejemplo, a tiempos de adición, de calentamiento o de enfriamiento, y márgenes de temperatura de trabajo. A la derecha se muestra un reactor esmaltado de 400 litros y con agitación. Este reactor está instalado en el departamento de fármacos del laboratorio central de la empresa BASF AG en Ludwigshafen. Los monitores del techo indican la presión, la temperatura y valor del *p*H en diferentes puntos del sistema. Tales valores nos ayudan a controlar el curso de la reacción. A la izquierda de la fotografía se puede ver un recipiente de adición montado sobre una balanza.

de este tenor hizo acto de presencia durante la síntesis de LU 103793, en concreto durante la metilación de la valina. Se procura que el aminoácido N-protegido reaccione con dimetilsulfato y ter-butilato de potasio en dimetoxietano como disolvente. Del ter-butilato de potasio, que no es del todo soluble, queda una parte en suspensión. En un volumen de reacción de 100 ml, en un matraz de 3 bocas, se obtuvieron rendimientos altos y buena selectividad. Pero cuando se trasladó la reacción a planta, el rendimiento bajó en picado.

El ter-butilato de potasio reacciona con el aminoácido para formar una sal dipotásica; ésta, en una segunda etapa, se metila por reacción con el sulfato de dimetilo. La sal dipotásica se acumula con el tiempo y, debido a su baja solubilidad, precipita. Hacia el final de la reacción, la velocidad de la misma viene determinada por la velocidad de redisolución de la sal dipotásica. El proceso, que implica un cambio de fase de sólido a solución, es a escala industrial mucho más lento que en el laboratorio y, por ende, mayor también el tiempo de reacción. A escala técnica, la dispersión de un sólido es mucho peor que a escala de laboratorio; en este caso, el remedio consistió en adicionar una pequeña cantidad de agua. Parte del ter-butilato de potasio se hidroliza y el ter-butanol resultante ayuda a solubilizar la sal dipotásica.

Cuanto más fases presenta la mezcla de la reacción, más dificultades entraña el aumento de escala. En el caso de transiciones gas/líquido o líquido/sólido, sobre todo si existe la misma velocidad en ambos sentidos, los resultados obtenidos en el laboratorio no deben extrapolarse a lo que habrá de suceder en fábrica.

Un problema muy frecuente de las reacciones en heterofase es el de la formación espontánea de espumas. A modo de muestra, citemos la hidrogenación catalítica en agua/5 % de ácido acético glacial. Mientras se trabaje en gramos no habrá ninguna dificultad, pero al pasar a planta aparecen, desde el mismo inicio de la reacción, grandes cantidades de espuma. La reducida proporción entre la superficie y el volumen de la solución ejerce un efecto negativo sobre el flujo del gas a través de la fase líquida.

Es bien conocida la tendencia a formar espuma que muestran las suspensiones de sólidos en agua cuando se hace burbujear un gas. Para obviar ese entorpecimiento se pone especial atención en el desarrollo cuidadoso de los procesos de carga y descarga del reactor y en la modificación del sistema de solvente.

Los sistemas bifásicos genuinos no se hallan exentos de formación de espuma. Recuérdese lo que acontece al calentar a reflujo la suspensión de un sólido. En el caso de la recristalización de un producto de una mezcla de agua/etanol, en que el procedimiento consistía en proceder a la carga del reactor con agua y después al calentar añadir una disolución en etanol del producto, conseguimos eliminar las espumas operando a la inversa: llenábamos el reactor con la disolución en etanol y agregábamos luego el agua.

El cambio de la viscosidad durante la reacción constituye otra fuente de problemas al aumentar de escala. La viscosidad del medio influye sobre el intercambio del calor y el transporte de la materia. En un matraz en agitación cuesta detectar un cambio de la viscosidad; pero si del laboratorio pasamos a planta, observaremos quizá la aparición, en las paredes del reactor, de una capa que actúa de aislante y evita la transmisión de calor hacia al exterior. A consecuencia del calor liberado en la reacción el disolvente puede ponerse a hervir sin control. Para prever este inconveniente se recurre a los agitadores de palas que se arrastran por las paredes del reactor.

De este último ejemplo hemos de colegir que los procesos de síntesis

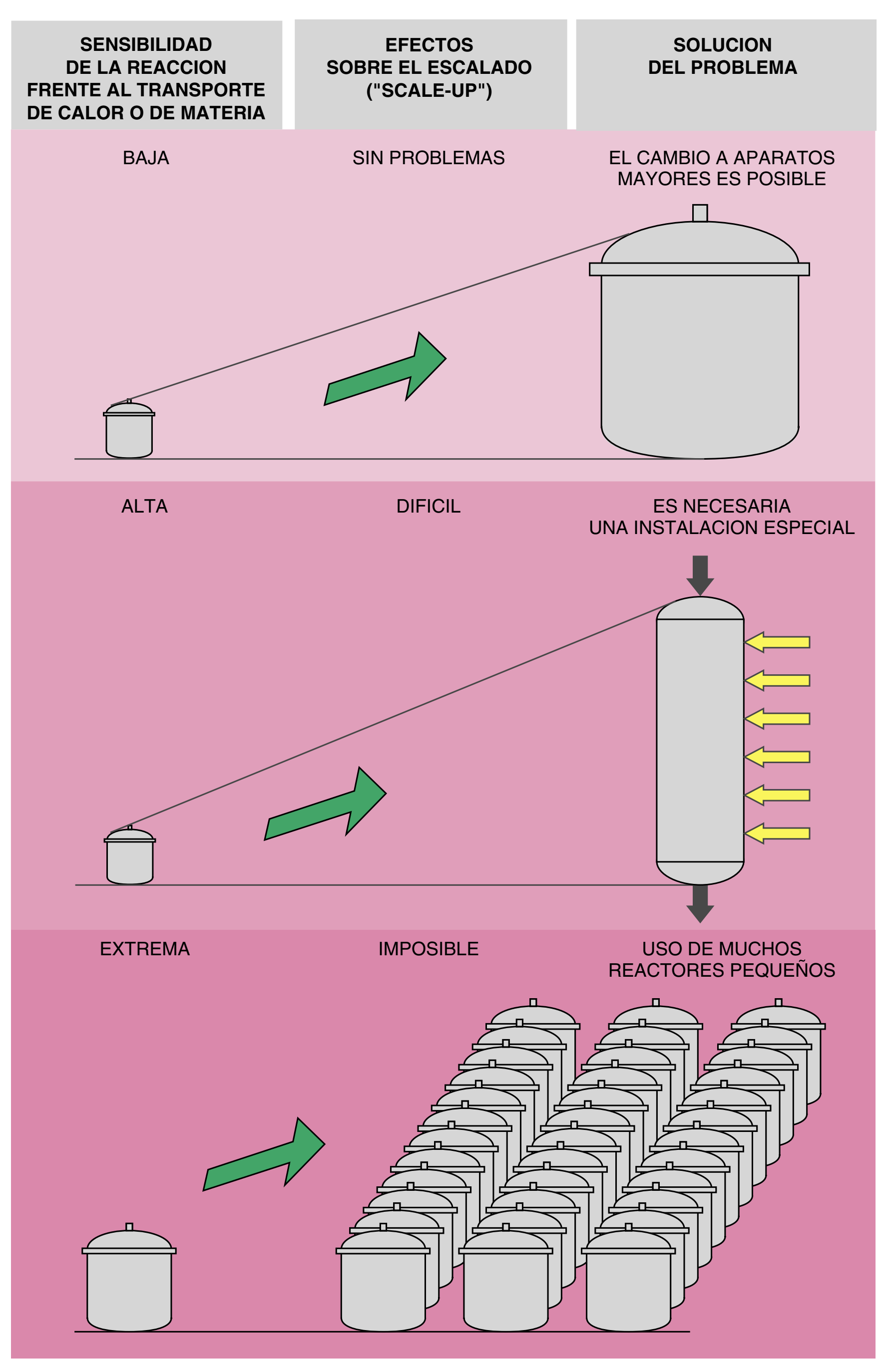
industriales no deben encerrar ningún peligro grave. Por eso resultan discutibles las reducciones con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) o hidruro de aluminio y litio ($LiAlH_4$), que se descomponen violentamente en presencia de agua y llevan a la formación de hidrógeno, un gas altamente inflamable. Deben cegarse todos los conductos que porten agua y cambiarse el sistema de refrigeración, por ejemplo, de agua a tolueno. Puesto que la reacción no transcurre de manera regular, importa controlar el balance de calor del reactor. Para que no se dé acumulación de hidrógeno, se trabajará en corriente de nitrógeno.

Separación y purificación

Un parte capital de la síntesis es la de aislar el fármaco de la mezcla de reacción. Consideraciones económicas y ambientalistas aparte, el producto será, pensando en el paciente, de alta calidad. Alcanzará un grado de pureza superior al 99 % y la concentración de cada una de las impurezas inferior al 0,1 %. En el caso de que el fármaco sea cristalino, las cualidades del cristal —granulometría, estructura, contenido en agua, etc.— son parámetros a tener también en cuenta, puesto que no sólo afectan a los procesos galénicos (transformación en pastillas), sino que influyen asimismo en la biosensibilidad del fármaco.

En la etapa de separación asistimos a la extracción líquido/líquido, la filtración, la difusión a través de membranas, la cristalización o precipitación y las separaciones cromatográficas. Los intermedios y el producto final son sólidos de punto de fusión alto, o sea, de presión de vapor baja; por no mantenerse estables ante la temperatura, se usa poco la destilación en el aislamiento de fármacos. Además, la técnica de destilación al vacío, que evitaría estos problemas, no resulta rentable debido al reducido tonelaje requerido. Lo acostumbrado es eliminar los disolventes por destilación, una tarea sencilla que sólo en casos excepcionales puede poner en peligro la síntesis. Si el calentamiento para efectuar la destilación se produce a través de la pared del reactor, el resultado dependerá del nivel de escala de la síntesis.

Un caso así apareció durante la síntesis de LU 103793, uno de cuyos pasos consiste en la esterificación de la prolina con metanol (CH_3OH) en presencia de cloruro de tionilo



5. LAS DIFICULTADES encontradas en los estudios de aumento de escala ("scale-up") dependen principalmente de la sensibilidad de la reacción frente a procesos físicos, como el transporte de materia o de calor. Si la sensibilidad es baja, no hay problemas de escalado. Si mediana, debe recurrirse a una variante de la reacción o a soluciones especiales en la instalación; por ejemplo, el montaje de un circuito de refrigeración adicional. En el peor de los casos, puede reducirse la carga y efectuar la reacción simultáneamente en varios reactores pequeños.

($SOCl_2$), formándose como productos secundarios cloruro de hidrógeno (HCl) y dióxido de azufre (SO_2). Al acabar la reacción, se elimina el metanol sobrante por destilación a presión reducida. Al pasar la reacción a escala industrial, los rendimientos bajaron del 99 % al 90 %; durante la eliminación del disolvente por destilación el éster obtenido se hidroliza en un 10 %: debido a la mayor permanencia en el reactor, se produce la reacción del HCl con el metanol para dar cloruro de metilo y agua, que hidroliza el éster. Es frecuente encontrar trampas similares en procesos de aislamiento de aparente sencillez.



6. EN EL AUMENTO DE ESCALA hay un aspecto que merece máxima atención: la seguridad. Resulta obligado que el proceso fabril tenga pocas fuentes de error y, si se presentan, que no puedan encerrar riesgo alguno. A este propósito, resultan cuestionables las reducciones con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) o hidruro de aluminio y litio ($LiAlH_4$). Estos reactivos se descomponen violentamente con agua y provocan la formación de hidrógeno, gas altamente inflamable. Tanto en el sistema del reactor como en su periferia hay que restringir el uso de agua. En el sistema de refrigeración se sustituirá el agua por tolueno, cegando todas las conexiones que puedan conducir agua al reactor o a sus inmediaciones. La reacción es difícilmente regulable, por lo que, además, debe vigilarse su evolución a través del balance calorífico del reactor u otro medio. Para evitar la acumulación de hidrógeno se trabajará en corriente de nitrógeno.

Cristalización y precipitación

La precipitación, o cristalización, de una sustancia disuelta seguida de la separación del sólido es un proceso de bajo coste. Además, la sustancia no se expone a un calentamiento excesivo, el grado de pureza acostumbra ser alto y el proceso requiere poca manipulación. Aunque se trata de un paso universal en el aislamiento de fármacos, requiere atención y experiencia.

No es tarea trivial dar con las condiciones experimentales adecuadas para que cristalice una substancia. Muchos fármacos poseen una estructura compleja, y eso se refleja en los procesos de disolución y cristalización, igualmente complejos. El péptido LU 103793 constituye un ejemplo arquetípico. Para disolver péptidos satisfactoriamente no recurriremos a disolventes polares, que se verían incapaces de actuar ante la presencia de grupos polares.

La velocidad del crecimiento del cristal depende de las fuerzas intermoleculares, que resultan muy complejas en presencia de grupos polares de la molécula y en el caso de moléculas grandes. La polarización molecular crea diferencias en vez de armonía. Durante mucho tiempo no se halló disolvente idóneo para cristalizar la molécula de LU 103793. Se pensó entonces en la purificación cromatográfica, muy laboriosa. Cuando empezaba a agotarse el tiempo previsto para la optimización de esta separación, se consiguió la cristalización del producto en clorhidrato, a partir de una mezcla de metiletilcetona e isopropanol.

Importa atender también a las condiciones de la cristalización: velocidad de enfriamiento y velocidad de adición del medio precipitante. No se olvide tampoco que en la cristalización pueden intervenir impurezas. Este problema adquiere especial relieve en el caso de fármacos que demandan una síntesis larga. Para mejorar los rendimientos deben limitarse los pasos de purificación al mínimo posible. Debido al estrecho margen de tiempo que se concede a las cuestiones de escala, se abordan a la vez los pasos de síntesis y de purificación. Para ello, se acostumbra recurrir al empleo de substancias externas. Un fallo extremo sería, por ejemplo, el de un producto de partida de mala calidad que, en vez de proporcionar un precipitado cristalino y filtrable, llevara a la formación de una suspensión difícil de filtrar. El problema se evita empleando productos de partida de calidad controlada, lo que no nos libera de investigar cada cristalización o precipitación y su dependencia de las modificaciones en procesos previos.

En planta, la optimización de un proceso de cristalización o de precipitación busca un mejor rendimiento y la obtención de un sólido dotado de determinada estructura cristalina. (Según sea la distribución del tamaño de partículas del sólido, así será la dificultad del proceso de filtración.) Además de fijar un procedimiento óptimo de cristalización (velocidad de agitación, gradiente de temperaturas y otros parámetros), hemos de acometer ensayos que nos manifiesten la sensibilidad del proceso ante las variaciones de las condiciones experimentales. Estas cursan a veces de modo caprichoso. En cierto experimento, no se pudo cargar la centrífuga por problemas técnicos; la suspensión permaneció, bajo agitación ligera, en el reactor varias horas. Al cabo de este tiempo el sólido, antes fácilmente sedimentable, se había convertido en una especie de goma. El sólido por lo visto era extremadamente sensible a la fricción.

Se prefieren los precipitados gruesos, que se filtran mejor que los finos. Si el fármaco es poco soluble en agua, conviene un precipitado fino. De esta manera la mayor superficie de las partículas del fármaco facilita la resorción en el organismo y la biodisponibilidad. Por eso, un procedimiento óptimo para suministrar un principio activo insoluble o poco soluble en agua consiste en dispersarlo finamente en un soporte sólido. Estas dispersiones sólido/sólido retienen el fármaco en la matriz rígida del soporte. La rigidez de la matriz impide la difusión del fármaco, que en caso de producirse provocaría su agregación en entidades de mayor volumen. El caso ideal lo representa la solución sólida. Al tratar al precipitado con agua, la matriz se disuelve y la substancia activa aparece en una granulación finísima, que, por su gran superficie activa, se dispersa sin dificultad.

La preparación de una solución sólida venía siendo un procedimiento caro y laborioso. Pero la situación ha cambiado con la extrusión de una mezcla fundida, procedimiento ideado en

BASF y en su filial Knoll. El principio activo y un polímero soluble en agua, termoplástico y biocompatible (éter de celulosa o polivinilpirrolidona) se funden, se homogeneízan y se extruyen a la manera de los termoplásticos. El producto de extrusión se granula y se prensa para que adquiera la forma de pastillas.

Algunas sustancias presentan polimorfismo cristalino. Las formas cristalinas diversas pueden diferir mucho entre sí; pensemos en el grafito y el diamante. A presión y temperatura definidas, sólo una de las versiones cristalinas es la estable, lo que significa que, con el tiempo, las otras se transforman en ésta. Si la velocidad de la transformación es muy baja, se obtienen formas metaestables, que perduran en el tiempo a pesar de ser menos estables.

Un fármaco conocido por su polimorfismo es el barbiturato Veronal. Hay hasta 11 formas cristalinas distintas. La verdad es que el fenómeno del polimorfismo reviste notable interés en la industria farmacéutica. La solubilidad y la resorción difieren mucho de una versión a otra, por lo que la biodisponibilidad y la eficacia farmacológica pueden ser muy distintas. Del palmitato de cloramfenicol, un antibiótico, se conocen dos formas, una activa e inactiva la otra. Además, las soluciones o cremas preparadas a partir de una forma metaestable pueden alterarse con el tiempo al adoptar el principio activo la conformación estable. En estos casos en la preparación farmacéutica acostumbran a aparecer sedimentos o segregación de cristales.

La obtención de una determinada forma cristalina depende, entre otros factores, de la polaridad del disolvente, del valor del *p*H y de la temperatura. En la sublimación (solidificación a partir de la fase gas) y en la solidificación por enfriamiento de una substancia fundida aparece a menudo la mezcla de varias formas cristalinas. Corresponde a la técnica de los procesos de síntesis de fármacos descubrir si se da polimorfismo y dirigir la síntesis hacia la versión cristalina deseada.

El polimorfismo de un fármaco puede convertirse en objeto de patente. La ranitidina (un inhibidor de la hipersecreción gástrica) presenta dos versiones cristalinas. En este caso, ambas formas desarrollan la misma actividad. Pese a ello, sólo una está protegida por patentes. La otra forma puede prepararse libremente, pero antes debe demostrarse que no es metaestable y que al cabo de cierto tiempo no se convierte en la forma patentada, protegida.

$$\text{prolina (NH, } CO_2H) \xrightarrow[-\,SO_2,\ -\,HCl]{+\,CH_3OH,\ +\,SOCl_2} \text{éster } (\oplus NH_2\ Cl^{\ominus},\ CO_2CH_3)$$

$$CH_3OH + HCl \longrightarrow CH_3Cl + H_2O$$

$$\text{éster } (\oplus NH_2\ Cl^{\ominus},\ CO_2CH_3) \xrightarrow[-\,CH_3OH,\ -\,HCl]{+\,H_2O} \text{prolina (NH, } CO_2H)$$

7. EN LOS ESTUDIOS de escalado hasta los métodos sencillos de síntesis pueden provocar dificultades inesperadas. En uno de los pasos del LU 103793, en la preparación de un éster de la prolina a partir de cloruro de tionilo, prolina y metanol (*ecuación superior*) a escala de laboratorio, el rendimiento es del 99 %. Se elimina por destilación al final el metanol sobrante. Sin embargo, la destilación a escala industrial precisa de un tiempo más prolongado, lo que obliga a contar con la reacción secundaria de formación de agua a partir de metanol y cloruro de hidrógeno (*ecuación central*); en efecto, el agua formada hidroliza parte del éster (*ecuación inferior*); los rendimientos a escala técnica son sólo del 90 %.

Cromatografía

La purificación por cristalización o precipitación conlleva mermas inevitables. Siempre queda en solución una parte más o menos importante del producto. En principio es posible aislar la sustancia, pero el procedimiento es laborioso. Con la cromatografía se evitan esas pérdidas. Por cromatografía se entiende la separación de sustancias mediante su reparto entre una fase móvil y una fase fija. La cromatografía en columna, por ejemplo, emplea un tubo vertical rellenado de un sólido absorbente; por la parte superior se aplican los fluidos concentrados, para su absorción por la fase activa sólida; desde arriba, luego, pasa disolvente de manera continua. Puesto que las sustancias a separar se absorben en la fase sólida con diferente intensidad, se van eluyendo de arriba abajo a un ritmo distinto y forman zonas discretas; éstas se recogen en la salida inferior de la columna y se concentran en las correspondientes fracciones.

Aunque obligados los métodos cromatográficos en los protocolos de laboratorio, no suelen entrar en los procesos fabriles, por una doble razón: hay que invertir en disolventes y deben efectuarse en instalaciones especiales, distintas de las usuales en síntesis técnica. Si, además, la separación no es perfecta, se prescindirá de fracciones que representan solapamientos entre substancias, lo que implica un menor rendimiento.

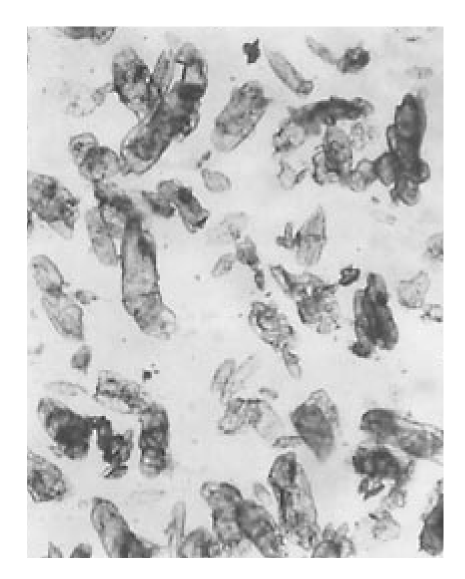
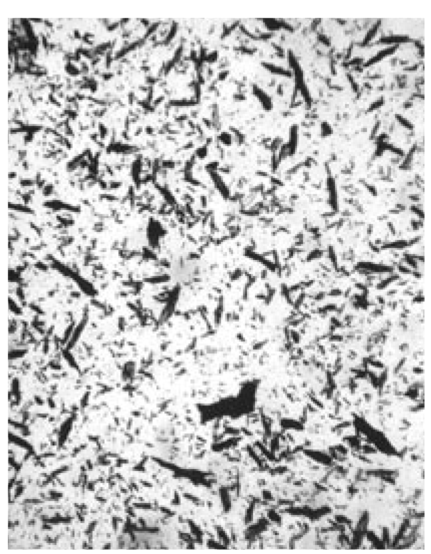
Una adaptación interesante de la cromatografía a los requerimientos de la producción industrial es la cromatografía de lecho móvil simulado (SMB), de introducción reciente. En el marco de esta técnica la purificación no se obtiene por cargas discontinuas de la columna, sino por el aporte continuo de fluidos de alimentación más disolvente a contracorriente de la fase sólida activa.

El lecho móvil de relleno se simula por intercambio rítmico del sentido de flujo de la solución con respecto al absorbente, que está dividido en 8, 12 o 16 segmentos. A lo largo del eje del absorbente se forma un gradiente de concentración, que se mueve con el flujo del solvente, si bien parece inmóvil como resultado del cambio de sentido del flujo. Por eso se pueden extraer productos y subproductos de manera continua por la cara lateral del contenedor del absorbente. Se evitan así las pérdidas por solapamiento de fracciones de la cromatografía tradicional; al tratarse de un proceso continuo, el consumo de disolvente es también mucho menor que en las cromatografías al uso.

Merced a tales ventajas, la cromatografía SMB ha encontrado aplicación en la separación de fructosa de glucosa, en la separación de xilenos, que difieren entre sí sólo por la posición en el anillo del benceno de uno de sus dos grupos metilo, y otros procesos industriales. Por lo que a la química farmacéutica se refiere, la nueva técnica cromatográfica reviste interés en la resolución de mezclas racémicas. Nosotros, cuando otros medios de separación se mostraron inoperantes, nos servimos de ella en purificaciones del orden de kilos.

Gestión de la calidad

Una vez sintetizado el fármaco en planta, se procede a su ensayo clínico en humanos. El producto tiene que haber alcanzado su máxima calidad. El perfil de impurezas del fármaco que llega a la fase de investigación clínica tiene que ser comparable con el del producto de

8. EN EL ESCALADO hay que tener también en cuenta las variaciones de calidad de las materias primas. En la síntesis de un ácido carboxílico cierta variación de ese tipo comportó las espectaculares consecuencias que muestran las fotografías. En vez de un producto filtrable (*izquierda*) aparecieron lodos (*derecha*) que obturaron los poros de los filtros, haciendo inviable el proceso de filtración. El problema lo causó una pequeña impureza que afectaba al proceso de cristalización.

la toxicología preclínica. Por norma general, la pureza supera el 99 %. Es obligatorio conocer las estructuras de todas las impurezas presentes en concentraciones superiores al 0,1 %. Para las impurezas de contenido a partir del 0,5 % se exige su síntesis y la correspondiente investigación toxicológica. Desde 1995 hay un código de normas sobre impurezas por las que se rige la industria farmacéutica europea.

Para determinar el grado de pureza se necesitan métodos analíticos fiables. El más importante es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Gracias a esta técnica se ha convertido en proceso rutinario la separación analítica de mezclas racémicas. En determinaciones cuantitativas se puede recurrir a la electroforesis capilar (donde los compuestos se separan al emigrar a través de un capilar por la influencia de un campo eléctrico) y a la cromatografía en capa fina. La presencia de restos de disolvente se detecta por la cromatografía de gases "head-space" (análisis por cromatografía de gases de los vapores que un sólido o un líquido generan en cierto volumen).

La mayoría de los fármacos son sólidos. Su análisis se realiza, pues, sobre partes discretas del sólido. De ahí la importancia de la toma de muestras y la exigencia de que el producto presente una distribución de calidad homogénea. Debe asegurarse, además, que al repetir el proceso el producto se obtiene siempre con el nivel de calidad exigido. Todos estos objetivos los cubren los procedimientos de buena manufactura, o normas GMP.

Para el producto farmacéutico acabado, las tabletas por ejemplo, el cumplimiento de las GMP es obligatorio desde hace años. Más reciente es su imposición en la preparación de las substancias activas. El control del cumplimiento de las normas corre a cargo de inspectores del país donde están autorizadas las substancias activas. Existe un organismo supervisor general: la Convención para la inspección farmacéutica, o PIC.

De esa institución no forman parte los Estados Unidos. Por eso, ante la magnitud del mercado norteamericano, muchos laboratorios farmacéuticos se ajustan a las normas de la Administración para la Alimentación y los Fármacos (FDA). Con buen criterio se está intentando armonizar las normas GMP con las de la FDA. Las normas GMP exigen una documentación exhaustiva del desarrollo del fármaco, desde los ensayos de laboratorio hasta la síntesis en planta del primer kilo de sustancia. Deben especificarse meticulosamente las condiciones necesarias para el funcionamiento correcto del método de síntesis industrial. Esta descripción empieza con el tipo de lavado de los aparatos en donde se efectuará la síntesis. Puesto que un mismo aparato sirve para la preparación de varios productos, es obligatoria la eliminación de impurezas extrañas al método, en especial las de otras substancias activas. La limpieza de la instalación se inspecciona a simple vista, las partes ocultas se inspeccionan con un endoscopio. En caso de duda se desmonta el aparato y se procede a la limpieza de las partes. Las normas GMP extienden sus exigencias a la documentación sobre la atribución y las responsabilidades de todas las personas implicadas en el proceso.

Antes de introducir el fármaco en el mercado hay que cumplir con otra norma de los GMP: la validación del proceso, tarea que consiste en demostrar la eficacia del proceso para la preparación del fármaco con especificaciones definidas. En el proceso de validación deben definirse los parámetros críticos del proceso y la tolerancia (márgenes de variación) de los valores de éstos. Tomemos por ejemplo una purificación por recristalización. Hay que empezar por disolver el producto en caliente. Un calentamiento prolongado puede implicar la formación de un producto parcialmente alterado como consecuencia de una degradación térmica. Son, pues, parámetros críticos la temperatura y el tiempo total de la cristalización. Conviene efectuar un ensayo de laboratorio para determinar los márgenes de tiempo admisibles y evitar la degradación. Podría convenir también fijarse en el contenido en agua de los disolventes, puesto que muchos productos se hidrolizan con relativa facilidad. A escala industrial, los disolventes empleados contienen en torno al 1 % de agua. De lo que se infiere que en el proceso de validación debe determinarse el máximo porcentaje admisible de agua, independientemente de que en todo el proceso sintético no se supere nunca el 1 %. La parte final de la validación consiste en la preparación de tres lotes del fármaco, en las condiciones especificadas en el procedimiento, para someterlos a un análisis exhaustivo.

Las normas GMP incluyen muchos otros puntos. Se refieren al procedimiento a seguir en el caso de una variación en la síntesis de los productos; abordan el uso de productos que no cumplan especificaciones; consideran las autorizaciones y calificaciones industriales de la instalación; atienden a la calibración sistemática de los instrumentos de medición en los puntos críticos del proceso y a las condiciones de almacenamiento



9. PROCEDIMIENTOS CROMATOGRAFICOS muy innovadores han permitido que la separación de substancias por distribución entre una fase sólida y una fase líquida ocupe un lugar central en el sistema de producción industrial. En la fotografía se trata de un instrumento que simula un sistema de contracorriente. Mediante un intercambio rítmico de las entradas y salidas de flujo de las 16 columnas conectadas en serie se simula un lecho flotante del absorbente inmovilizado en las columnas. Ello permite una cromatografía continua, que utiliza poco disolvente y evita el solapamiento de fracciones, lográndose en consecuencia un mayor rendimiento.

de los intermedios y del fármaco acabado. Todo esto, y mucho más, con un solo objetivo: asegurar la calidad del fármaco.

Cuando en el mercado aparece un medicamento nuevo que vence una enfermedad grave, el público y los medios de comunicación elogian al científico responsable del descubrimiento o de la primera síntesis. Pero sólo la fabricación industrial posibilita que el fármaco llegue a millones de personas; nadie, sin embargo, parece caer en la cuenta del trabajo y de la imaginación necesarios para convertir una substancia de laboratorio en un producto técnico. Volviendo a nuestro ejemplo, LU 103793 se encuentra en la fase II de pruebas clínicas; se investiga su efecto citostático en enfermos de cáncer.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

REACTION SYSTEMS FOR BULK PHARMACEUTICAL PRODUCTION. E. Paul, en *Chemical Engineering Science*, vol. 10, págs. 320-325, 1990.

DRUGS QUIRALITY, SCALE-UP, MANUFACTURING AND CONTROL. H. J. Federsel, en *Chemtech*, vol. 23, n.º 12, págs. 24-33, 1993.

CHIRALE ARZNEIMITTEL, SCALE-UP, KONTROLLE UND DEREN BEDEUTUNG FÜR DIE PHARMAZEUTISCHE FORSCHUNG. H. J. Federsel, en *Chemie in unserer Zeit*, vol. 27, n.º 2, páginas 78-87, 1993.

PILOT PLANTS: MORE SELECTIVE, MORE EFFECTIVE. N. Chopey, en *Chemical Engineering*, volumen 103, n.º 8, págs. 33-39. Nueva York, 1996.

Biotecnología de fármacos

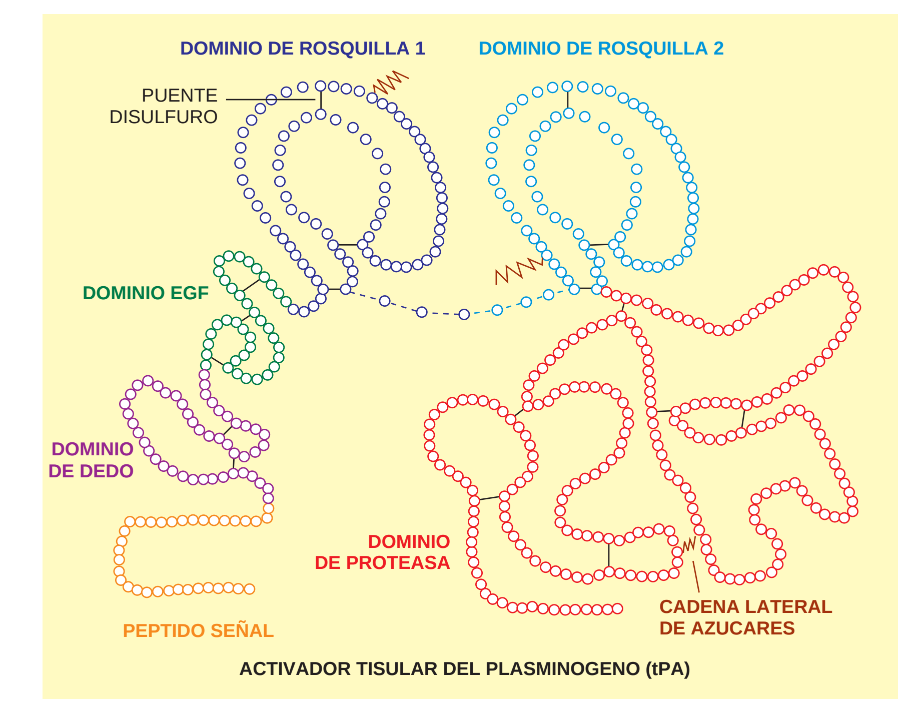
Primero se sintetizaron proteínas humanas con técnicas tomadas de la ingeniería genética. Luego se diseñaron fármacos a medida con material hereditario. Ahora queda que el organismo enfermo fabrique él mismo las proteínas correctas

Gabor Stiegler, Georg-Burkhard Kresse y Peter Buckel

Las técnicas al uso en ingeniería genética están demostrando su importancia capital en la investigación, desarrollo y síntesis de nuevos fármacos, vacunas y medios diagnósticos. Cuando se combinan con los métodos de larga tradición en biología, y acrisolados en la producción de antibióticos mediante hongos y bacterias, se habla entonces de biotecnología. Los procedimientos clásicos de obtención de proteínas eran poco rentables y limitados a una gama restringida. Hoy, gracias a la biotecnología, podemos fabricar proteínas animales y humanas (y también péptidos, esto es, cadenas de aminoácidos, como las proteínas, pero más cortas) para fines medicinales.

Desde hace muchos años se vienen aislando de orina, sangre y otros tejidos (humanos y animales) proteínas terapéuticas con métodos bioquímicos tradicionales. Piénsese en los factores de la coagulación o en la insulina. Las moléculas obtenidas salvan vidas de sujetos con un defecto de síntesis congénito o adquirido. Por dar una muestra, la insulina procedente de páncreas de cerdo regula los niveles de glucosa en sangre de los diabéticos de tipo I, que desde su juventud padecen un déficit de síntesis de la hormona.

Los tratamientos con proteínas animales que presentan diferencias respecto de las de sus homólogos humanos pueden provocar una respuesta inmunitaria. Son pocas las veces en que, con modificaciones mínimas —así en el caso de la insulina porcina—, se puede transformar la molécula foránea en su correspondiente humana. Los tejidos humanos son una fuente escasa y, lo mismo que la sangre, corren además el riesgo de estar contaminados por gérmenes. En el tratamiento del enanismo congénito con hormona de crecimiento, o somatotropina obtenida de hipófisis de cadáveres, se han descrito casos de transmisión de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, una patología que transforma el cerebro de los que la padecen en una masa esponjosa. Algo similar ha sucedido en hemofílicos, infectados con el



1. LA RETEPLASA es una proteína de segunda generación sintetizada mediante ingeniería genética. Se emplea en la disolución de trombos sanguíneos. Su precursor es el activador tisular del plasminógeno (tPA) (*izquierda*). En esta molécula se distinguen dominios con funciones innecesarias o incluso indeseables desde el punto de vista terapéutico. Se han eliminado los segmentos de ADN correspondientes a estos dominios del gen del tPA de las cepas bacterianas

virus VIH, agente del sida, o con virus causantes de hepatitis. Sólo la ingeniería genética nos revela en su plenitud el potencial terapéutico de las proteínas humanas.

Con la ayuda de cultivos industriales de bacterias o de células superiores se pueden producir grandes cantidades de proteínas, incluso de aquellas que se encuentren en el cuerpo en concentraciones muy bajas. La estructura primaria de estas proteínas es idéntica a la de las originales, por lo que el riesgo de sensibilización inmunitaria es mínimo, aun cuando el tratamiento se prolongara varios años. Para evitar la transmisión de enfermedades se mantiene un severo control de las condiciones de cultivo. En algunos casos la ingeniería genética ha desplazado a los protocolos tradicionales de aislamiento de la proteína; ha ocurrido así, por ejemplo, en el caso de la somatotropina. En otros, las nuevas técnicas han permitido disponer de la molécula en cuestión; tal ha acontecido con la hormona eritropoyetina, que estimula la formación de glóbulos rojos. También es posible modificar proteínas naturales para que su aplicación clínica sea óptima.

Las nuevas técnicas han simplificado el desarrollo de las vacunas, a la par que han incrementado su seguridad. La moderna vacuna de la hepatitis consta de una sola proteína de la envoltura, sintetizada por una levadura modificada por ingeniería genética. Pero el éxito más notable corresponde a la producción de medios diagnósticos. Casi todas las proteínas contenidas en tales productos se fabrican hoy en día con técnicas genéticas.

Potenciales de mercado

La importancia económica de la ingeniería genética molecular dentro del sector farmacéutico merece un inciso. Desde que la empresa Eli-Lilly introdujera hace quince años la insulina humana recombinante, los fármacos sintetizados con esos procedimientos técnicos han representado una fracción creciente del mercado farmacéutico. En 1995 movieron 18.000 millones de marcos, el triple que en 1990, y se espera que la cifra se vuelva a triplicar en el año 2000. Un estudio del Instituto Prognos de Basilea ha estimado que, a largo plazo, un 20-25 % del mercado farmacéutico mundial se abastecerá con estos medicamentos. En 1996, en todo el mundo estaban autorizados 32 fármacos con principios activos sintetizados mediante ingeniería genética.

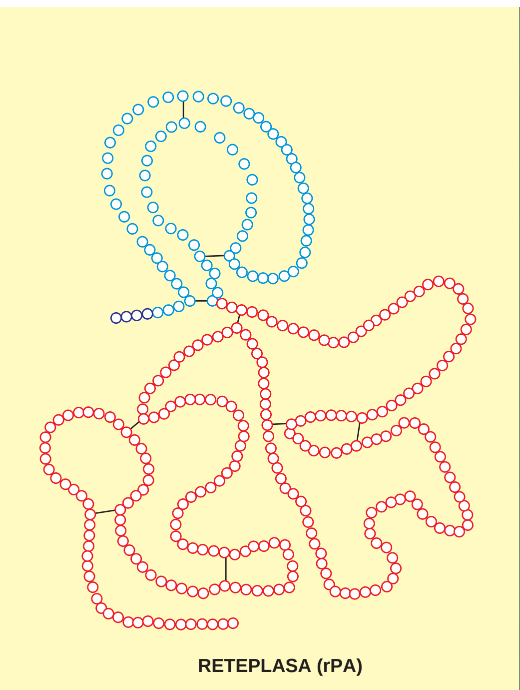
Las pequeñas empresas de biotecnología han demostrado su eficacia en la investigación de productos y nuevos caminos gracias a su alto grado de especialización. Se estima que en el año 2002 más de doscientas substancias desarrolladas por estas empresas habrán llegado a la última fase de ensayo clínico y son de esperar nuevas sorpresas y fármacos novedosos.

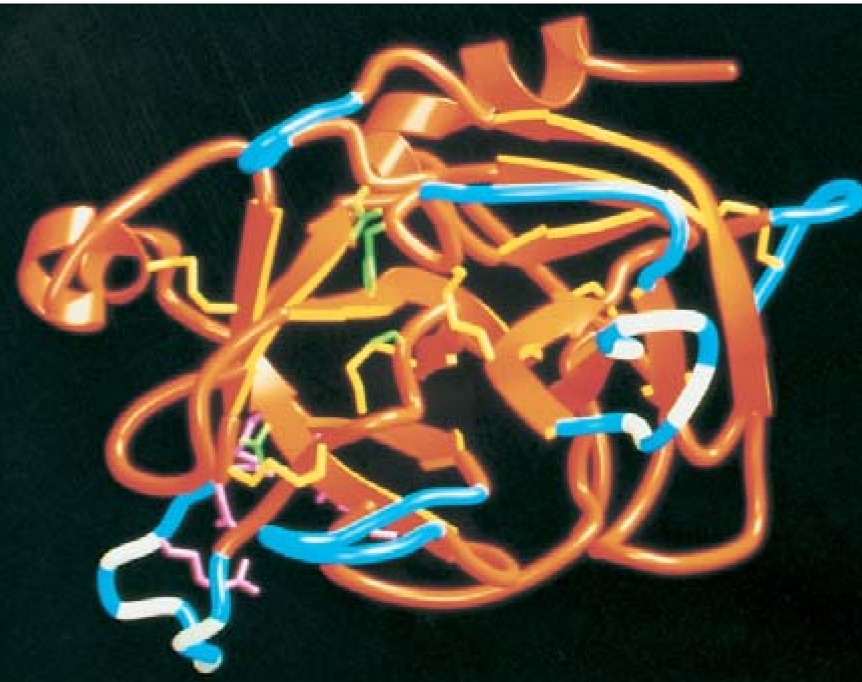
GABOR STIEGLER, GEORG-BURKHARD KRESSE y PETER BUCKEL trabajan para los laboratorios Boehringer Mannheim GmbH de Penzberg. Stiegler estudió biología en Giessen y Munich, centrándose en inmunología y virología. Kresse dirige el departamento de investigación y desarrollo de la división de terapéutica. Buckel enseña en la Universidad de Munich.

El año pasado, el número de empresas europeas de biotecnología registró un aumento del 60 % y se situó en 716. Por otra parte, continúa el proceso de concentración de la industria farmacéutica, plasmado en cooperaciones, alianzas y adquisiciones.

Proteínas recombinantes

El despegue de la ingeniería genética comenzó a inicios de los años setenta con el descubrimiento de las enzimas de restricción. Con estas tijeras moleculares podemos cortar la molécula de ADN por donde



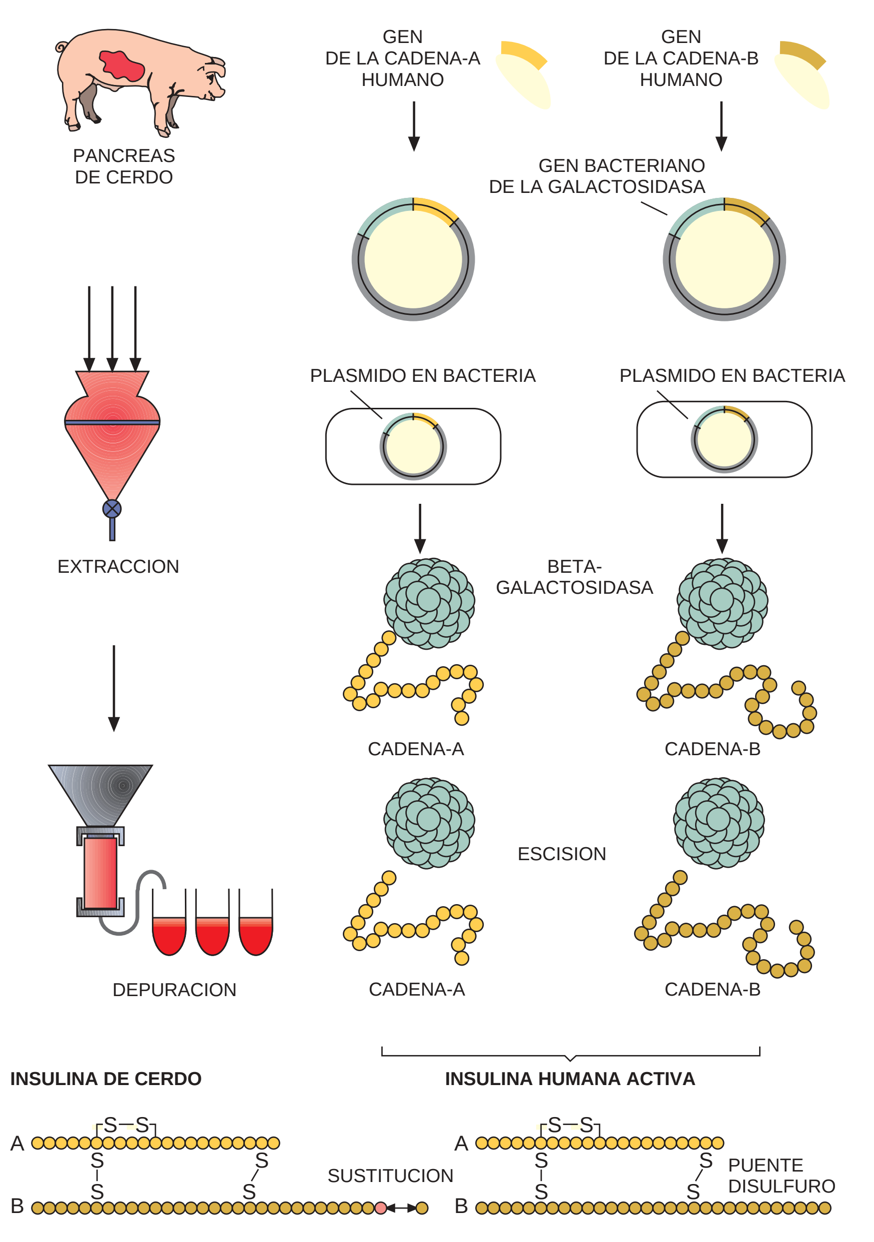


productoras de reteplasa. La enzima carece de las cadenas laterales de azúcares que se agregan tras la síntesis proteica al tPA debido a las deficiencias de la maquinaria bacteriana, pero esto sólo supone una ventaja adicional. El modelo por computador (*derecha*) de Wolfram Bode y Martin Renatus, del Instituto Max-Planck de Bioquímica de Martinsried, destaca los aminoácidos catalíticos importantes (*en verde*) y los que forman puentes disulfuro (*en amarillo*).

nos interese, para uncirla luego en otros fragmentos de ADN y formar configuraciones inéditas. La nueva molécula recibe el nombre de ADN recombinante. En 1973 se sintetizó la primera molécula de ADN recombinante.

Todos los seres vivos compartimos el mismo código genético, el lenguaje en el que se especifican las instrucciones precisas para la síntesis de proteínas. Ello significa que podemos introducir material genético foráneo en una célula. Si insertamos un gen humano en el material genético de una bacteria, ésta fabricará la proteína correspondiente, siempre y cuando la información foránea contenga también los elementos necesarios para la expresión del gen.

Las bacterias presentan la ventaja de multiplicarse en cultivo de una manera vertiginosa si se dan condiciones óptimas de ventilación, temperatura y suministro de nutrientes, entre otros. En teoría, a partir de una sola bacteria que se divida cada veinte minutos, se formarán un billón de células en poco más de medio día. Si se seleccionan cepas de alto rendimiento, la cantidad de proteína sintetizada contenida en cada célula puede representar la mitad de su peso. Se entiende que las bacterias se consideren ideales para producir cantidades ingentes de una proteína concreta, aunque en el organismo ésta sólo se sintetice en proporciones mínimas.



2. OBTENCION DE INSULINA PORCINA y producción de la hormona en bacterias a través de los procedimientos de ingeniería genético-molecular. La insulina extraída del páncreas de cerdo difiere de la humana en un aminoácido; el intercambio catalítico mediado por enzimas la transforma en insulina humana (*izquierda*). La hormona producida en bacterias mediante ingeniería genética permite cubrir la creciente demanda, sin que importe la disponibilidad de la insulina de cerdo. En el método mostrado, los genes que cifran cada una de las dos cadenas que forman la insulina madura se colocaron en el genoma bacteriano justo detrás de los que dirigen la síntesis de beta-galactosidasa (*derecha*). Las bacterias sintetizan esta enzima junto con la cadena correspondiente. Después de separar las cadenas de insulina de la enzima, ya sólo queda unirlas.

Existen muchas proteínas humanas que, una vez fabricadas, no pueden desempeñar su función a menos que sufran ciertas modificaciones en las células somáticas, cambios éstos que una bacteria no es capaz de operar; nos referimos, por ejemplo, a la adición de cadenas laterales de azúcares. Las levaduras, al igual que las células superiores simples, sí pueden, pero la maquinaria bioquímica que emplean difiere de la que trabaja en animales y humanos. Algunas glicoproteínas (del griego *glykos*, dulce) sólo se sintetizan de forma correcta en cultivos celulares animales o humanos.

La hormona eritropoyetina (EPO) constituye un buen ejemplo. Para su fabricación se recurre a grandes cultivos de células de ovario de hámster chino. No se piense que este tipo de cultivo precisa del sacrificio continuado de animales. Las células pertenecen a líneas celulares que se multiplican en cultivo desde hace décadas. Gracias a ciertas alteraciones hereditarias han adquirido la facultad de dividirse de forma indefinida, como si de organismos unicelulares se tratara.

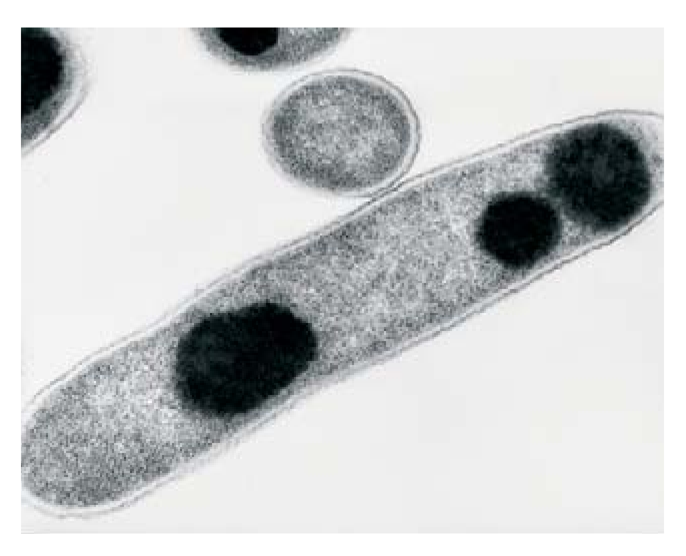
Para la síntesis de proteínas se toman estas células y se las cultiva en suspensión en tanques de hasta más de mil litros de capacidad. El proceso guarda estrecha semejanza con la fabricación de cerveza, en la que se cultiva levadura en grandes cubas con una solución de maltosa. Pero las células de hámster chino son muy exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Necesitan una suerte de sopa artesanal formada por aminoácidos, hidratos de carbono, vitaminas y factores de crecimiento que les son vitales. Además las células de los mamíferos se dividen a una velocidad mucho menor que las bacterias —las de ovario de hámster chino lo hacen cada 24 horas—, por lo que hay que esperar una semana para disponer de un número sufi-

ciente de células a partir del cultivo inicial.

El procedimiento es caro y la higiene prioritaria. Una sola bacteria que pasara del alambique al medio de cultivo, en cualquiera de las distintas fases de multiplicación, bastaría para colonizarlo y arruinar todo el proceso. Las células de hámster vierten las moléculas de eritropoyetina recién sintetizada al medio líquido envolvente. Habrá luego que separarlas del resto de substancias a través de diversos procesos de purificación: precipitación, filtración y cromatografía en columna.

La síntesis de proteínas en cultivos bacterianos presenta el inconveniente de que éstas no pueden extraerse directamente del medio. Sí pueden sacarse con facilidad de las propias células. Las cepas industriales sintetizan moléculas en cuantía tal, que embota la metabolización necesaria para la vida de las bacterias. Estas reaccionan con la formación de gránulos insolubles o cuerpos de inclusión. Cuando se juzga que se tiene una cantidad suficiente de proteína, se filtran las bacterias y se las somete a grandes presiones. Luego se solubilizan los agregados de proteínas. En esta fase se debe ir con tiento para que la molécula pueda recuperar al final su estructura espacial natural. Si no lo lograra, tampoco podría desempeñar su función.

Se trata de una verdadera obra de arte bioquímica. Algo así como transformar un huevo duro en uno crudo. Se utilizan grandes cantidades de hidrocloruro de guanidinio. Esta sal deshace los agregados proteicos dejando desplegada la cadena de aminoácidos. La concentración de la sal se reduce de forma progresiva para dar tiempo a que las cadenas recuperen su estructura espacial fisiológica. Esta renaturalización, delicada y laboriosa, tiene un rendimiento variable que depende de la proteína.



3. LAS BACTERIAS PRODUCTORAS hacen frente al exceso de proteína foránea mediante la formación de agregados densos, los cuerpos de inclusión. Aquí los vemos en color oscuro en imagen de microscopía electrónica. Pueden llegar a representar la mitad del peso de la célula. Una vez lisadas las bacterias, las proteínas se separan con facilidad, pero hay que añadir ciertas sales que faciliten su despliegue. La concentración de las sales remite de forma progresiva para que la proteína adopte su estructura espacial natural, configuración en la que puede ejercer su función. La imagen fue tomada por Victor Colombo y François Gerber, de Hoffmann-La Roche de Basilea.

Farmacia de granja

Una fuente alternativa de síntesis de proteínas recombinantes con finalidad terapéutica nos la ofrecen animales y plantas transgénicos. Hasta hoy se han introducido genes humanos en embriones femeninos de cabras, cerdos, ovejas y vacas. Estos genes llevaban asociado un interruptor que faculta únicamente a las células de las mamas para producir la molécula. El producto se recoge directamente de la leche del animal. Con este sistema se podrían fabricar, a un coste barato, proteínas humanas en gran cantidad.

De la "farmacia de granja" salió la antitripsina alfa (AAT), extraída en leche de oveja. Esta enzima facilita la respiración en pacientes afectos de cierto tipo de enfisema pulmonar. Hasta entonces, la proteína se extraía de plasma humano y sólo podían tratarse alrededor de un tercio de los pacientes con un coste de 3,5 millones de pesetas por individuo. Si en cada litro de leche de oveja transgénica hay unos 30 gramos de AAT, con un rebaño de 500 o 1000 ovejas transgénicas se tendría bastante para tratar a todos los enfermos.

Esta técnica presenta algunos inconvenientes. Muy laboriosa, el índice de éxito en la obtención de un solo animal que produzca la substancia deseada en cantidad suficiente es muy bajo. No basta, pues, con un animal; se requiere un rebaño entero. Por eso se investigan métodos que permitan clonar individuos mediante división de embriones o transferencia de núcleos. Luego se podría dirigir la multiplicación de los individuos clonados con técnicas tradicionales de cría de ganado.

La universalidad del código genético está borrando la frontera que separaba la biología "roja" de la "verde", la zoología de la botánica. Un equipo de investigación dirigido por Michael C. Marden, del Hospital Bicetre, ha logrado insertar el gen de la hemoglobina, un pigmento sanguíneo, en plantas de tabaco (se confía en poder fabricar un sustituto de la sangre a partir de esta hemoglobina). Dos compañías estadounidenses esperan producir vacunas, anticuerpos monoclonales y otras proteínas terapéuticas en plantas de maíz y soja.

La naturaleza copia

A lo largo de millones de años de evolución, las proteínas han ido determinándose para desempeñar funciones específicas. Las que fracasaron, desaparecieron. Por ello no cabe esperar efectos tóxicos, cancerígenos o teratógenos en el tratamiento sustitutivo de proteínas aplicado a pacientes con algún defecto fisiológico en la síntesis de las mismas. Las proteínas recombinantes de primera generación tienen la misma secuencia de aminoácidos que las naturales. Casi todas las proteínas terapéuticas que se pueden comprar hoy en día pertenecen a esta categoría, con independencia de si se han preparado en cultivos de bacterias o de células superiores.

Un ejemplo muy típico lo proporciona la eritropoyetina. Hubo que esperar hasta la introducción de la ingeniería genética para disponer de esta hormona. En el hombre adulto, la molécula se sintetiza en el riñón para que estimule en la médula ósea la diferenciación de las células precursoras a eritrocitos. Las personas que padecen una enfermedad renal crónica sintetizan a menudo cantidades insuficientes de eritropoyetina. Las sesiones de diálisis suplen la función de filtro del órgano lesionado, pero no corrigen el déficit hormonal. Aparece así anemia, que causa un descenso en el aporte de oxígeno a los tejidos. La calidad de vida de los

enfermos disminuye de forma notable: se quejan de cansancio crónico, sensación de frío y debilidad general de las extremidades. Antes se recurría a repetidas transfusiones como único medio para mitigar los síntomas. Además del consabido riesgo de contagio de infecciones latentes, las transfusiones sobrecargan el organismo con hierro, lo que afecta al hígado y al corazón. Si se administra a estos pacientes eritropoyetina recombinante, los glóbulos rojos aumentan en pocas semanas y el estado físico y psíquico del individuo mejora. En la actualidad entre el 30 y el 50 por ciento de todas las personas en diálisis en el mundo, lo que supone unas 300.000, reciben tratamiento hormonal sustitutivo. Todas disfrutan de una mayor calidad de vida gracias a la ingeniería genética. Este ejemplo ilustra a la perfección la capacidad de las proteínas recombinantes para tratar patologías adquiridas, no sólo hereditarias como la hemofilia y el enanismo congénito.

Síntesis a medida

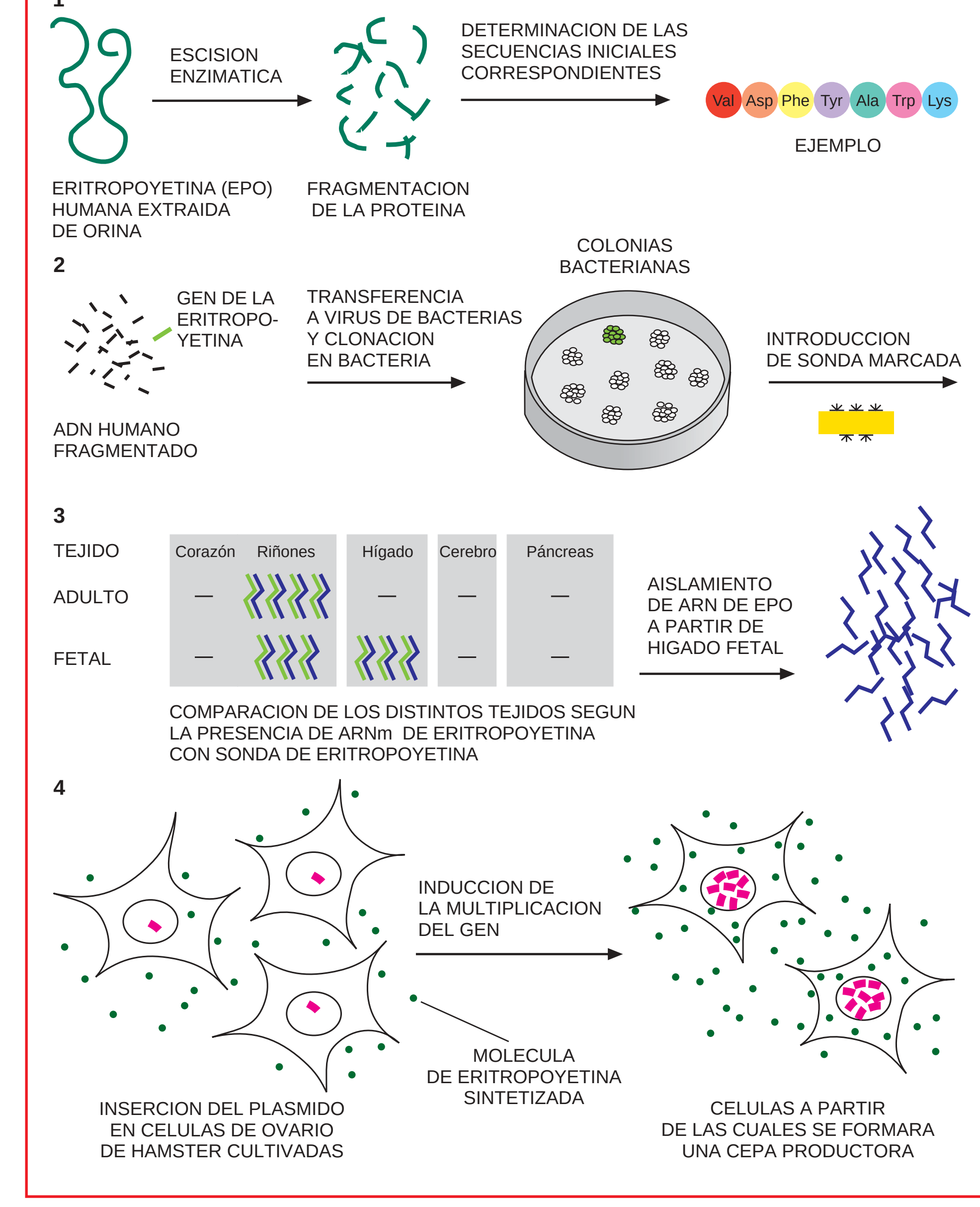
El conocimiento creciente de la relación entre la estructura terciaria (tridimensional) de las moléculas biológicas y su función abre el horizonte a una síntesis a medida de las indicaciones terapéuticas. Bien es cierto que las moléculas naturales han sufrido a lo largo de la evolución un proceso de optimización, mediante procesos de mutación y selección. Pero ello no significa que no se puedan mejorar para su empleo clínico.

Así, se pueden unir genes o fragmentos de genes para formar material genético nuevo. La molécula sintetizada según las nuevas instrucciones genéticas se conoce como proteína de fusión o híbrida. Se recurre a esa práctica para combinar anticuerpos monoclonales, o sólo sus regiones de reconocimiento, con otras proteínas. De estas quimeras moleculares se espera en la lucha contra el cáncer la eficacia de un proyectil mágico que controle por sí mismo su llegada al objetivo. La parte correspondiente al anticuerpo es la encargada de reconocer a la célula tumoral, anclarse en ella e introducir en su interior el principio activo que lleva acoplado, que podría ser una toxina bacteriana. La inmunotoxina es una especie de quimiofármaco de acción preferente contra las células tumorales.

Se pueden fabricar anticuerpos biespecíficos mediante fusión genética. Estas moléculas tienen dos brazos

Fabricación de una cepa productora de eritropoyetina

La hormona eritropoyetina estimula la formación de eritrocitos. Puede ahora sintetizarse con la ayuda de células de mamífero que se han sometido a manipulación genética. Son las únicas células de cultivo que realizan todas las modificaciones necesarias para que la proteína cumpla su función (como la adición de cadenas laterales de azúcares), antes de liberarla al medio de cultivo. Al principio, cuando se desconocía la secuencia del gen, se extraía la proteína de orina humana. Se determinaron algunos segmentos de la cadena de aminoácidos y se dedujeron las posibles secuencias de ADN (primer paso). Con esta información se sintetizó un fragmento de ADN marcado radiactivamente, que sirvió de sonda para localizar en una genoteca un fragmento de ADN humano natural que codificara un segmento de eritropoyetina (segundo paso). La genoteca se va constituyendo con fragmentos de material genético humano introducidos uno a uno en



un virus de bacterias; se clonan bacterias infectadas con estos virus pero se ignora qué información estaba cifrada en cada uno de los fragmentos. El fragmento del gen de la eritropoyetina identificado se marcó radiactivamente y se utilizó a su vez también como sonda para identificar células del organismo que fabricaran mucho ARN mensajero de eritropoyetina (tercer paso). Este ARN encierra la información necesaria para la síntesis de la hormona codificada; por eso se tradujo a ADN con la intervención de una enzima. El ADN resultante se clonó en bacterias y se transfirió luego a células extraídas del ovario de hámster. Se empleó un vector génico construido de suerte tal que, en presencia de cierta substancia, indujera una multiplicación del gen, fenómeno conocido como amplificación (cuarto paso). Estas células son muy rentables. Se realizaron sucesivos cultivos a partir del banco celular original y las células resultantes se emplearon para la producción en cultivos industriales.

diferentes y cada uno de ellos reconoce un elemento distinto; de esta manera pueden poner en contacto una célula tumoral y una célula asesina del sistema inmunitario. Sin embargo, no se conoce prácticamente ninguna estructura molecular exclusiva de las células cancerosas, lo que obliga a extremar las precauciones con este tipo de fármacos. Además, las estructuras extrañas al organismo, como son las toxinas bacterianas, provocan una respuesta inmunitaria que inactiva la molécula y limita el empleo repetido.

Otra estrategia que permite adecuar la estructura de la proteína a los requerimientos de su función terapéutica consiste en la eliminación de alguna de sus partes. El laboratorio Boehringer Mannheim de Penzberg aplicó esa idea al desarrollo de la reteplasa, un medicamento indicado en el tratamiento del infarto agudo de miocardio. El infarto se produce por la oclusión de un vaso coronario con un coágulo. Se impone disolver en seguida el trombo, formado por un entramado de fibrina y plaquetas; de no hacerlo, aumenta la masa de tejido lesionado por la falta de perfusión. Para evitarlo se dispone de varias enzimas, como la estreptoquinasa bacteriana y, desde hace diez años, el activador tisular del plasminógeno (tPA). Ambas moléculas catalizan el paso de plasminógeno a plasmina, la enzima de nuestro organismo encargada de deshacer los agregados de fibrina.

En la proteína tPA se distinguen varias regiones o dominios constituidos por segmentos de la cadena de aminoácidos. Los dominios se corresponden en el material genético a segmentos codificantes (exones), que en los mamíferos se encuentran separados por segmentos no codificantes (intrones). La mayoría de los dominios tienen funciones conocidas. Con ingeniería genética se podrían suprimir en las proteínas sintetizadas artificialmente las funciones innecesarias o incluso indeseables para un tratamiento mediante la eliminación de los dominios correspondientes.

El hígado, por ejemplo, elimina rápidamente de la sangre el tPA natural. Para que se encuentre disponible allí donde más interesa durante un tiempo prolongado, deben administrarse dosis relativamente altas. Esto comporta un elevado riesgo de hemorragias internas que pueden lesionar el cerebro y causar parálisis, si no la muerte. Aún presenta el tPA otra característica indeseable: su tendencia

Células implicadas en la producción biotecnológica de fármacos

La elección de una célula productora viene determinada no sólo por criterios económicos, sino también por las normas reguladoras de los países. En la práctica, son tres los organismos o células más utilizados en la síntesis de proteínas terapéuticas; están perfectamente caracterizados, dado que su empleo se remonta varios años. Se dispone de una amplia batería de métodos de modificación genética. Se puede controlar la eliminación de la proteína de forma que se libere al medio (en *E. coli* también al espacio entre la membrana celular y la pared bacteriana) o se almacene en el interior de la célula.

	Ventajas	Desventajas
E. coli (bacteria)	Tiempo de reproducción corto, fermentación rápida, cultivo sin complicaciones Materia prima barata Varias cepas de seguridad disponibles	Las proteínas recombinantes sintetizadas acostumbran acumularse en el interior de la célula convertidas en cuerpos de inclusión (una nueva ventaja, ya que pueden separarse de las proteínas bacterianas y salvarse de la degradación) Sin modificaciones
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	Crecimiento rápido, cultivo sencillo No se producen cuerpos de inclusión Se pueden realizar modificaciones en las proteínas recombinantes	Las glicosilaciones no son idénticas a las de las células superiores Las proteínas glicosiladas por levaduras pueden ser inmunógenas y provocar reacciones inmunitarias
Células de ovario de hámster chino (línea establecida de células de mamífero)	Están establecidos varios sistemas de transferencia génica Existe la posibilidad de amplificar el gen foráneo Se pueden emplear cultivos de adhesión y en suspensión Patrón de glicosilación muy parecido al humano	Cultivo laborioso y caro Rendimiento relativo bajo (en comparación con *E. coli* y levadura)

a fijarse firmemente a la superficie del coágulo de fibrina (donde reacciona con plasminógeno ligado), lo que le impide actuar en el interior.

Con el fin de mejorar la eficacia clínica de la proteína, se introdujo en las bacterias productoras solamente la información genética correspondiente a los dos últimos dominios del total de cinco que componen la molécula. Rige un principio en virtud del cual cada dominio adopta su estructura tridimensional de forma independiente de los demás. De no cumplirse esta premisa, se produciría la pérdida de la capacidad funcional de la proteína y se convertiría en objeto de ataque por el sistema inmunitario, pues al presentar alterada su estructura espacial la reconocería como extraña.

La reteplasa (rPA), esta molécula de síntesis a medida, tiene una vida media en el organismo tres veces más larga que su contrapartida natural. Además, se une de manera más débil a la superficie de los trombos, por lo que puede alcanzar una profundidad mayor y disolver antes el coágulo. Al sintetizarse en bacterias, carece de las moléculas de azúcar que se agregan al final de la síntesis al tPA. Por fortuna, este detalle no sólo no interfiere en su función, sino que incluso la mejora, pues favorece que su eliminación se retarde. La mayor virtud de esta molécula le viene de su prolongada permanencia en la sangre: no se tiene que administrar en infusión continua, como sucede con el tPA, sino que puede inyectarse. Ante un infarto agudo de miocardio, cada minuto cuenta, y la reteplasa ofrece la posibilidad de iniciar el tratamiento de forma inmediata.

Las proteínas también se optimizan mediante procesos que producen mutagénesis dirigidas. Se pueden cambiar piezas muy concretas de un gen clonado o provocar mutaciones aleatorias en segmentos cortos. Con ello se obtiene una serie de proteínas mutadas (mutaínas), alguna de las cuales puede presentar la característica buscada.

A veces, la modificación de la estructura proteica mediante ingeniería genética sólo persigue la simplificación del proceso de síntesis. La mutaína betaferón, autorizada para el tratamiento de la esclerosis múltiple, difiere de su equivalente humano, el interferón beta, en un solo aminoácido: se ha sustituido, en cierta posición, el aminoácido cisteína por serina con el fin de evitar la formación de puentes disulfuro no deseados (estas uniones transversas entre cisteínas estabilizan la estructura tridimensional de la proteína cuando aparecen

en las localizaciones correctas). Sus propiedades terapéuticas no se ven afectadas por esta modificación. Pero las mutaínas presentan secuencias extrañas al organismo (aunque se deban a una alteración singular de la cadena de aminoácidos) y pueden, en principio, inducir la formación de anticuerpos que inactivarían en sangre el medicamento en posteriores administraciones.

Este último supuesto carece de interés en las proteínas sintetizadas con procedimientos de la ingeniería genética que se utilizan en diagnóstico. Se han optimizado ciertas enzimas para su empleo como biocatalizadores en reacciones de identificación mediante aportación de substancias mutágenas a las bacterias con el gen foráneo y selección de las productoras de la variante enzimática idónea.

La imposibilidad de administrar las proteínas terapéuticas por vía oral constituye una objeción de peso. En el tracto digestivo, se escinden como cualquier otra proteína de la ingesta. Pero el recurso a polímeros disociables pudiera ser la solución para que las moléculas alcanzaran la circulación, sin sufrir daño alguno, y se transportaran luego al lugar de destino. Se investiga también la administración indolora de insulina a través de la piel con vaporizador a presión.

El largo camino hasta la farmacia

El mercado de la salud está sometido a la presión de los costes. Los convincentes éxitos que se consiguen en muchos casos con las proteínas recombinantes justifican su precio, relativamente alto en comparación con los fármacos sintéticos tradicionales. Obedece esto a la cuantiosa inversión en investigación y desarrollo y a la laboriosa producción de los medicamentos. El cultivo de células de mamífero a escala industrial resulta especialmente delicado. Además, las proteínas se suelen administrar a dosis altas, del orden de los 100 miligramos, lo que encarece aún más el tratamiento con principios activos de por sí tan caros.

Desde otro punto de vista financiero, las proteínas recombinantes salen mejor paradas. Uno de los factores que más encarecen los fármacos tradicionales es el tiempo empleado en su desarrollo, un intervalo que en los 30 últimos años se ha quintuplicado. Por regla general, suelen transcurrir más de diez años hasta su introducción en el mercado. Una vez se inician los primeros ensayo preclínicos, un nuevo principio activo químico sólo tiene una probabilidad del diez por ciento de obtener la autorización necesaria para su comercialización. El tiempo medio que se precisa para desarrollar un fármaco recombinante es notablemente más corto y la proporción de éxitos, un 40 por ciento, claramente superior. Uno de los motivos por los que se explican estas circunstancias es la mínima toxicidad que presentan las proteínas en comparación con los productos químicos. El empleo farmacológico de una proteína cuyo mecanismo de acción se conozca es mucho menos arriesgado que el de una substancia sintética.

Terapia génica

En el futuro las proteínas terapéuticas se sintetizarán directamente en el interior del organismo del enfermo. El tratamiento con fármacos recombinantes de tercera generación no consistirá en la administración substitutiva de la proteína defectiva, sino en la inserción de material genético para que sean las propias células las que fabriquen la molécula. Con ayuda de vectores apropiados, el ADN penetrará en el interior de las células del organismo y dirigirá la producción de la proteína indicada. Hasta el momento se ha ensayado con dos tipos de vectores: virus modificados, sobre todo adenovirus y retrovirus, y liposomas (microsferas lipídicas) y otras membranas.

Con su ayuda comenzará el tratamiento causal, no sólo sintomático, de las enfermedades genéticas. Naturalmente, no se pretende modificar los genes de las células germinales (ovocitos, espermatozoides y sus precursores). Se trata más bien de facultar a células somáticas del paciente para que ellas mismas se ayuden. Aún quedan varios obstáculos por superar, pero este método dilatará el horizonte de las posibilidades terapéuticas. De hecho, la administración exógena de estas proteínas sólo tiene sentido si cumplen su función en la sangre o en el medio líquido de los tejidos. Cuando falta un polipéptido que forma parte de la estructura de la misma célula somática que lo produce, su sustitución no es tan sencilla.

Precisamente éste es el problema que presentan las personas que padecen fibrosis quística. La mucoviscidosis, como también se la conoce, es una patología hereditaria frecuente que afecta a uno de cada dos mil recién nacidos en países occidentales. La característica que le da nombre es la presencia de secreciones especialmente viscosas en el árbol respiratorio y en los órganos del aparato digestivo, en los que produce lesiones progresivas. El paciente se encuentra amenazado de muerte precoz, a menudo por complicaciones pulmonares.

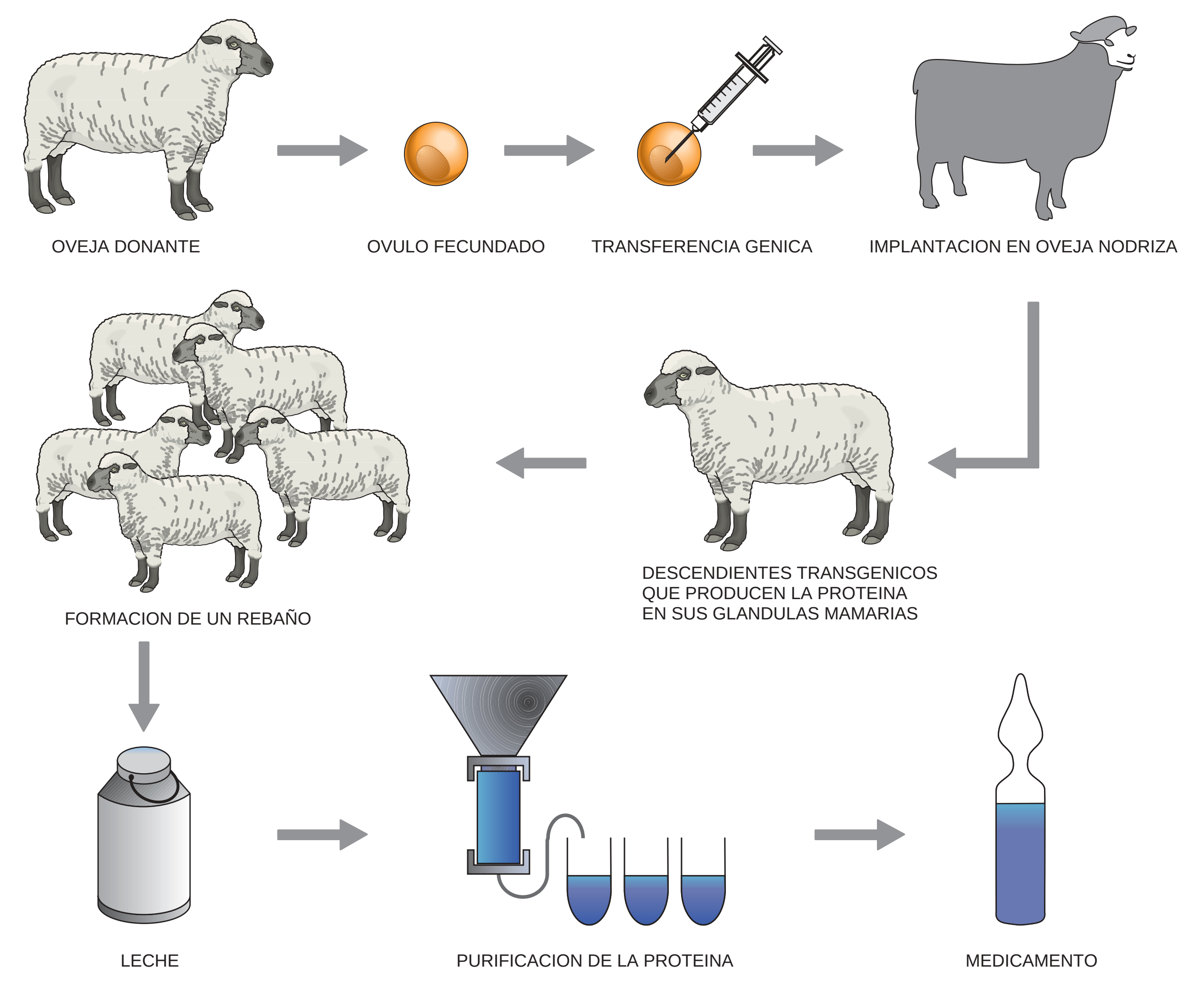
Esta enfermedad mortal sólo se desencadena si se hereda el gen defectuoso de ambos progenitores. Para evitar la enfermedad, las células afectadas deberían sintetizar la proteína implicada (un canal de iones cloruro), y colocarla en su membrana. Se pretende distribuir copias del gen intacto por toda la superficie pulmonar mediante vaporización con un aerosol de ADN y lípidos que debería facultar a la célula receptora a sintetizar por sí misma la proteína.

La investigación experimental sobre transferencia genética fuera del organismo (*ex vivo*) en células receptoras extraídas del paciente ha avanzado más que la transferencia directa en el interior del organismo (*in vivo*). Para dotar, por ejemplo, a células sanguíneas de una nueva carga genética, se extraen del enfermo células madre hematopoyéticas y se cultivan cierto tiempo. Si se infecta a éstas con vectores víricos, todas las células maduras que provengan de una célula madre modificada presentarán el nuevo gen, el sano.

Siguiendo este principio, en 1990 se procedió al primer ensayo de terapia génica en humanos, en una joven con déficit congénito de desaminasa de adenosina, una enfermedad en la que se acumulan productos del metabolismo celular. Esta patología se ensaña con las células precursoras de los leucocitos y es causa de un grave defecto inmunitario. En todo el mundo sólo se conocen treinta casos.

Más de la mitad de todos los ensayos clínicos con terapias génicas se centran hoy en el tratamiento del cáncer, la segunda causa de muerte en los países occidentales. La mayoría de las veces, el origen del cáncer se sitúa más en alteraciones que se van acumulando durante la vida celular que en factores hereditarios.

Uno de los enfoques terapéuticos se basa en ayudar al organismo a enfrentarse con mayor resolución ante las células tumorales. Un posible mecanismo podría consistir en la administración de una suerte de vacuna con células cancerosas del paciente modificadas mediante ingeniería genética para que sintetizaran mediadores inmunitarios, como la interleuquina 2.



4. LOS ANIMALES TRANSGENICOS constituyen una fuente alternativa de proteínas terapéuticas recombinantes. El gen que cifra la proteína se combina con un interruptor biológico que sólo se activa en las células de las mamas. La proteína se puede así aislar en la leche. Con este fin se ha introducido el gen de la enzima alfa-antitripsina en embriones hembra de oveja. Hasta ahora la única fuente de semejante enzima, muy rara, era el plasma humano.

El tumor captaría de esta manera la atención de las células de defensa y se produciría una respuesta inmunitaria. Se han conseguido los primeros éxitos en experimentación con ratones, pero en humanos no se ha descrito ningún tratamiento reseñable.

Otro planteamiento apunta a sensibilizar el tumor a un fármaco mediante transferencia de genes. En el tratamiento del glioblastoma, el tumor cerebral más frecuente, se ensaya la transferencia del gen del virus herpes simplex que codifica la quinasa de timidina. Las células cancerosas en división se tornan sensibles a la acción de un fármaco antivírico, el ganciclovir. Los resultados intermedios son esperanzadores: se ha observado un retroceso de la masa tumoral en aproximadamente la mitad de los pacientes.

Los laboratorios Amgen y Novartis investigan otra estrategia de terapia génica en el encéfalo que todavía no ha superado la fase inicial de ensayo clínico. Se trata de la enfermedad de Parkinson, en la que se da una pérdida progresiva de células nerviosas productoras de dopamina. Por ahora, lo más que se puede es frenar el ritmo de evolución de la enfermedad, pero no curarla. En un modelo animal se introdujo en la región cerebral afecta el gen del factor neurotrófico derivado de células de la glía mediante un vector adenovírico y se logró detener el proceso de muerte celular.

Los ejemplos seleccionados demuestran que con la ingeniería genético-molecular podemos afrontar el cáncer y otras enfermedades de tratamiento poco efectivo o desconocido hasta el momento. Los principios fundamentales de la terapia pueden entenderse con experimentación animal. Y es aquí donde más estrechamente deben trabajar la ciencia y la industria, porque para conseguir resultados significativos se necesitan estudios a mayor escala de la que pueden asumir equipos de investigación reducidos.

En esta línea, el laboratorio Boehringer Mannheim y el Hospital San Rafael crearon a finales del año pasado en Milán la compañía MolMed SpA. Los objetivos de esta asociación se centran en el desarrollo de vectores para terapia génica, la manipulación de células de pacientes y el correspondiente diagnóstico y los análisis de seguridad por procedimientos normalizados. Los médicos pueden recoger material, dejar muestras de células del paciente para que se analicen o enviarlo directamente en persona. Una empresa similar se ha fundado en julio de este año en la Universidad de California en San Diego. Es cierto que la inserción perfecta de ADN y la expresión de la proteína que codifica presentan todavía ciertos problemas.

Pero cuando se superen los obstáculos tendremos al alcance el tratamiento etiológico de enfermedades graves mediante moléculas biológicas.

Con ayuda de la terapia génica se pueden evitar algunas de las dificultades que plantea el tratamiento basado en la administración directa de proteínas recombinantes. Si fuera posible reprogramar células sanguíneas para que sintetizaran una proteína terapéutica concreta, el organismo obtendría el beneficio de unos niveles terapéuticos constantes en sangre. Si la proteína fuera necesaria sólo en algunos tejidos, se podría limitar a ellos su producción, con lo que, por un lado, se evitaría la eliminación biológica precoz de la molécula y, por otro, el paciente se ahorraría los efectos indeseados producidos por la actividad del fármaco en otras regiones del organismo. Esto mismo es lo que ha obligado a abandonar un tratamiento contra el cáncer en el que se habían depositado grandes esperanzas: la administración exógena de mediadores inmunitarios, como interferones e interleuquinas; los efectos secundarios son demasiado importantes.

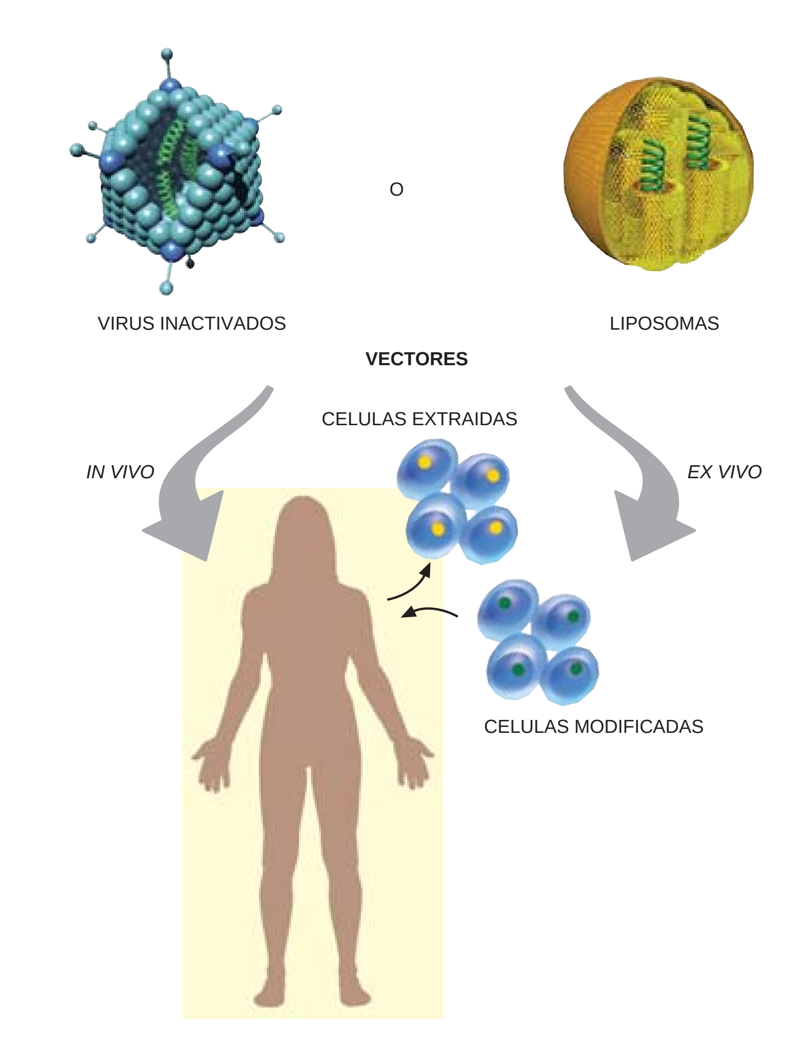
Perspectivas de futuro

Alemania es el país con mayor número de fármacos de síntesis genética disponibles en el mercado, pero produce únicamente 6 de los 32 que estaban autorizados en 1996 en todo el mundo. Sólo uno de ellos se desarrolló por entero en ese país. El laborioso proceso de autorización, debido a la gran desconfianza que la ingeniería genético-molecular suscita entre la población alemana, ha limitado su desarrollo y ha forzado a las empresas a trabajar en otros países. Los laboratorios Hoechst tuvieron que esperar trece años a que se les autorizase la fabricación de insulina humana. Para entonces ya se había perfeccionado un proceso de síntesis menos agresivo para el medio ambiente, pero la autorización no incluía estas modificaciones.

Los fármacos recombinantes han aumentado la seguridad de las terapias sustitutivas crónicas y han posibilitado el tratamiento de otras. La situación evoluciona de forma harto prometedora: en 1996 había 253 medicamentos recombinantes en fase de ensayo clínico y muchos otros están en las fases de desarrollo previas.

A medida que aumente nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a los distintos procesos patológicos se abrirán nuevas posibilidades de diagnóstico y tratamiento y se simplificará el descubrimiento de nuevos principios activos de origen químico. Así, una proteína puede servir de herramienta para comprobar la eficacia biológica de las moléculas sintéticas mediante procesos de criba muy amplios, como la comprobación de su capacidad para bloquear un receptor específico.

La medicina del futuro se fundará cada vez más en el conocimiento de nuestros genes. Antes del 2005 se habrá secuenciado todo el ADN humano en el marco del proyecto Genoma. Coordinado en todo el mundo y con unos costes totales de unos 3000 millones de dólares es el mayor proyecto de investigación conocido. Está al alcance la búsqueda de genes con funciones de interés médico. En manos de los hombres quedará la responsabilidad de hacer buen uso de este conocimiento.



5. LAS PROTEINAS TERAPEUTICAS del futuro, las de tercera generación, se sintetizarán en el propio cuerpo del paciente. El objetivo se centra en introducir las instrucciones genéticas que dirigen la producción de la proteína en vez de administrar la proteína ya formada. La transferencia genética puede tener lugar en células que se tomen del paciente (*ex vivo*) o directamente en el interior del organismo (*in vivo*). Como vectores génicos se ensayan virus inactivados y liposomas, unas estructuras esféricas constituidas por lípidos catiónicos en cuyo interior se encuentra el ADN que se pretende transferir.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

BIOTECHNOLOGIE. S. B. Primrose. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1990.

DAS HANDWERK DER GENTECHNIK. Peter Buckel, Ernst-Peter Fischer y Dietrich Nord. Piper, Munich 1991.

PROTEIN BIOTECHNOLOGY. Felix Franks. Human Press, Totowa New Jersey 1993.

GENTECHNIK. Katja Prowald. Südwest, Munich 1994.

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. B. R. Glick y J. J. Pasternak. American Society for Microbiology 1994.

Las vacunas: los fármacos del futuro

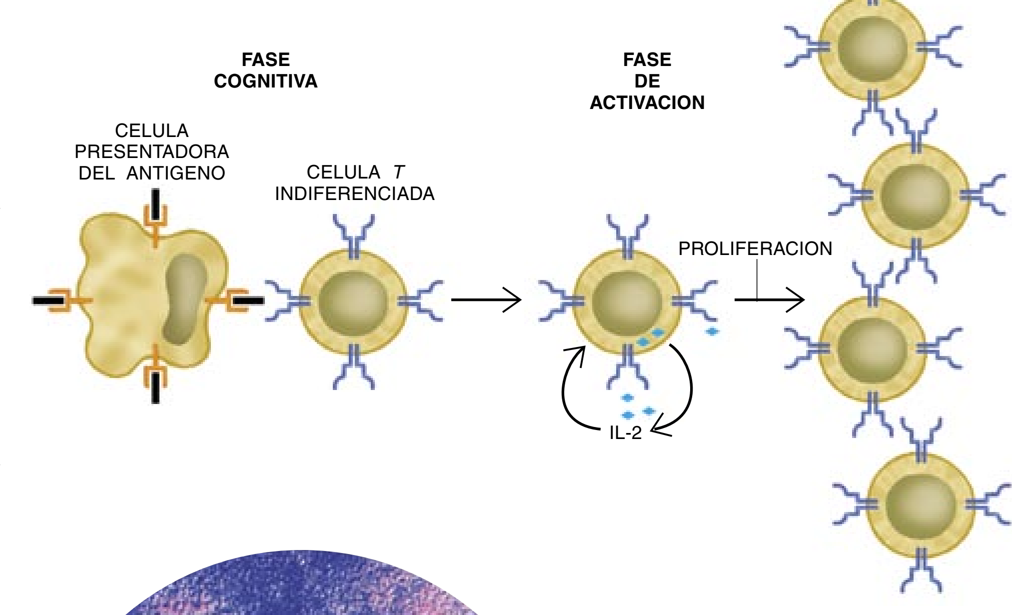
Mediante los métodos propios de la biotecnología, los investigadores han extendido el campo de acción de la vacunación preventiva a la inmunoterapia de tumores, infecciones crónicas y alergias

Rino Rappuoli, Sergio Abrignani y Guido Grandi

En el combate entre el ser humano y las enfermedades se distinguen tres períodos. El primero estuvo dominado por la superstición, característica de la sociedad primitiva. Se creía que las enfermedades eran un recurso que las dioses manejaban para recompensar o castigar a la humanidad. El único remedio, en estas circunstancias, era aplacar a la deidad a través del chamán o brujo, cuyo poder se agrandaba en su función mediadora.

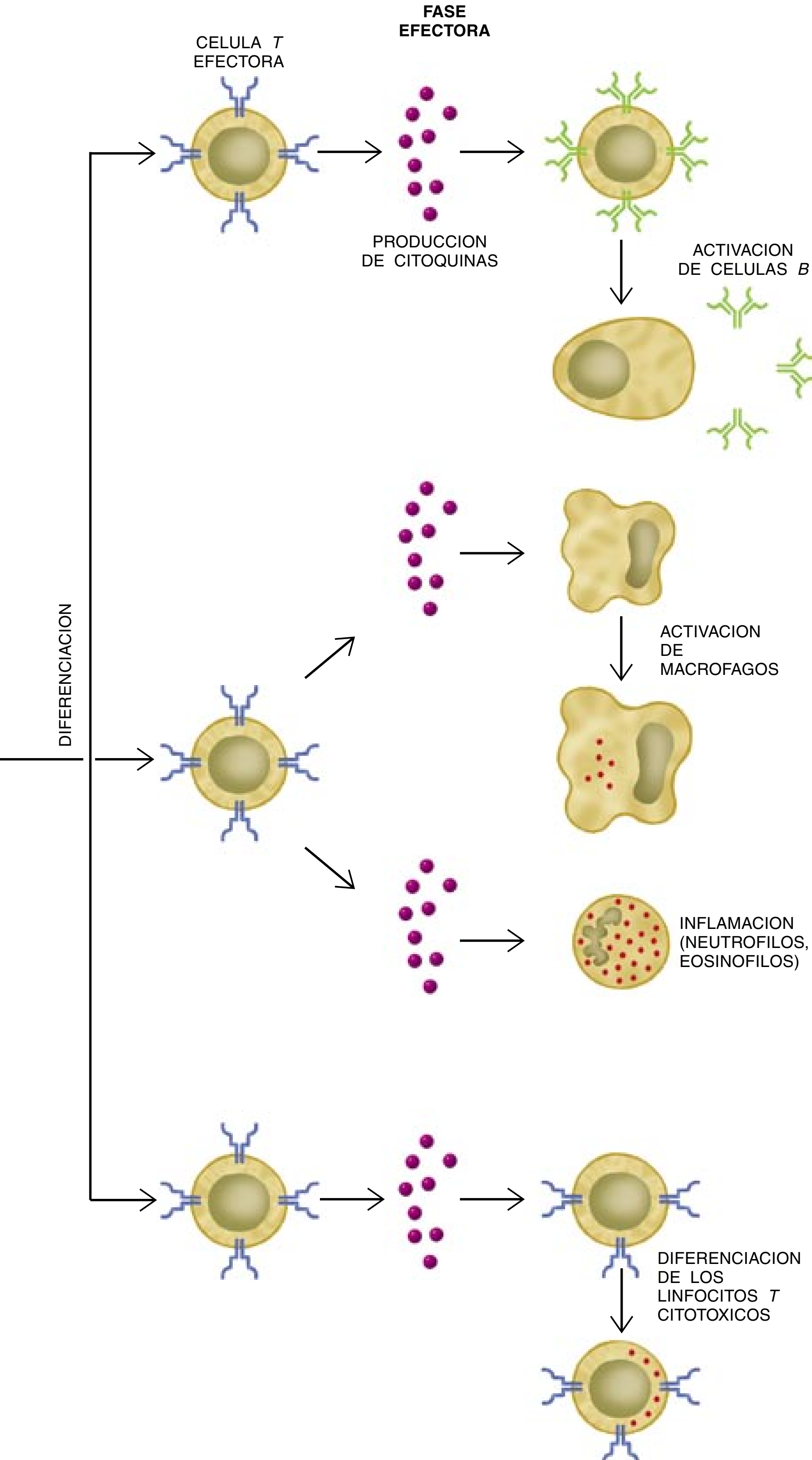
En el segundo período ha primado el conocimiento científico de los mecanismos que causan las enfermedades. Su principal acción ha sido la curación de la enfermedad, una vez definidos los síntomas. Esta fase, que comenzó de forma rudimentaria en el siglo V a.C. con Hipócrates, teórico y médico ejerciente, considerado padre de la ciencia médica moderna, alcanzó pleno desarrollo durante los siglos XIX y XX, hasta culminar en el refinamiento de la medicina actual. Pese al gran progreso científico y técnico de la medicina experimentado, el enfermar se acepta como una condición necesaria para el ser humano; la técnica sólo puede utilizarse para curar las enfermedades una vez manifestadas. El tercer período, el de la medicina del futuro, se basará en la prevención. Las vacunas, una de las herramientas más poderosas y rentables de la medicina preventiva, desempeñarán un papel fundamental en esta fase.

Antes de entrar en la naturaleza de las vacunas, hemos de introducir algunos conceptos de inmunología básica. Nuestro organismo está sometido a agresiones múltiples de parásitos, bacterias (extracelulares e intracelulares) y virus. Importa, pues, que el sistema inmunitario sepa clasificar estos agresores y armar una respuesta efectora capaz de eliminarlos. En el caso de las bacterias extracelulares y de sus productos tóxicos, la respuesta eficaz consiste en la producción de anticuerpos opsonizantes o neutralizantes. Si se



1. LA HEPATITIS B, que afecta a 300 millones de personas, se cobra cada año dos millones de vidas humanas. En 1976 el equipo de M. R. Hilleman, de los laboratorios Merck, confirmó la viabilidad de una vacuna contra el virus de esa forma de hepatitis.

RINO RAPPUOLI, SERGIO ABRIGNANI y GUIDO GRANDI desarrollan su actividad en los laboratorios farmacéuticos Chiron, de Siena. Allí Rappuoli, experto en patogenia molecular, coordina los trabajos sobre vacunas; Abrignani se centra en las respuestas inmunitarias ante las infecciones víricas, y Grandi dirige el departamento de biología molecular.



2. LOS PRINCIPALES MECANISMOS EFECTORES del sistema inmunitario son tres: producción de anticuerpos, inflamación y citotoxicidad. El antígeno pasa al interior de una célula presentadora de antígenos; ésta expone, en su superficie, fragmentos del mismo asociados con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Entonces, células *T* inactivas reconocen el complejo constituido por antígeno y MHC y se multiplican en consecuencia. Las células *T* activadas median los tres mecanismos efectores a través de la producción de citoquinas específicas.

trata de bacterias intracelulares que se replican en el interior de fagosomas, la respuesta más contundente corre a cargo de las células *T*, que activan los fagocitos en un proceso inflamatorio de hipersensibilidad retardada. Por último, si nos hallamos ante una infección vírica, aunque los anticuerpos específicos podrían limitar la difusión del virus a otras células, sólo una respuesta citotóxica acabará con las células infectadas y erradicará el virus.

Estos tres tipos de respuesta (anticuerpos, inflamación y citotoxicidad) son los mecanismos efectores del sistema inmunitario. Para que se activen las células *B* secretoras de anticuerpos, deben ellas absorber el antígeno y exponer en la membrana fragmentos del mismo en asociación con una estructura proteica específica, el complejo principal de histocompatibilidad de clase II. El compuesto constituido por antígeno y MHC de clase II lo reconocen luego las células *T* coadyuvantes que, a su vez, producen citoquinas; éstas estimulan la proliferación de las células *B* y la secreción de anticuerpos.

Por su parte, se produce la respuesta de los linfocitos *T* citotóxicos cuando las proteínas antigénicas se originan en el interior de las células. Acontece así con los patógenos intracelulares, como los virus. En este caso, los antígenos sintetizados en el interior celular, tras su degradación, aparecen en la superficie de las células en asociación con los componentes del MHC de clase I. Las células precursoras de los linfocitos citotóxicos reconocen luego los complejos antígeno-MHC de clase I y maduran transformándose en células asesinas que eliminan selectivamente las células infectadas por el patógeno.

Después de eliminar al agente invasor, nuestro sistema inmunitario “retiene su estampa”, de suerte que nuestro organismo lo reconozca en adelante y evite cualquier ataque del agente infeccioso. Los principales representantes de la memoria inmunitaria son los clones de células *T*; pueden sobrevivir durante largos períodos, incluso la vida entera de un individuo. A través de la producción de citoquinas, los clones facilitan la activación de las células *B* productoras de anticuerpos y de las células *T* citotóxicas precursoras, cuando vuelvan a encontrarse con el microorganismo de su especificidad.

El principio de la vacunación se nos ofrece entonces en su máxima llaneza. A través de la vacuna quedamos

expuestos a un “material biológico” que imita al agente infeccioso. Por eso, el sistema inmunitario desencadena la resistencia ante el patógeno y lo memoriza, sin experimentar la infección ni la enfermedad. El proceso viene a ser como introducir en el organismo un “chip” de memoria con determinadas instrucciones. Para vacunar contra un patógeno, se inocula en el organismo un microorganismo muerto (vacunas muertas), un microorganismo vivo pero incapacitado para desencadenar la enfermedad (vacunas vivas atenuadas) o una porción purificada del patógeno (vacunas subunitarias).

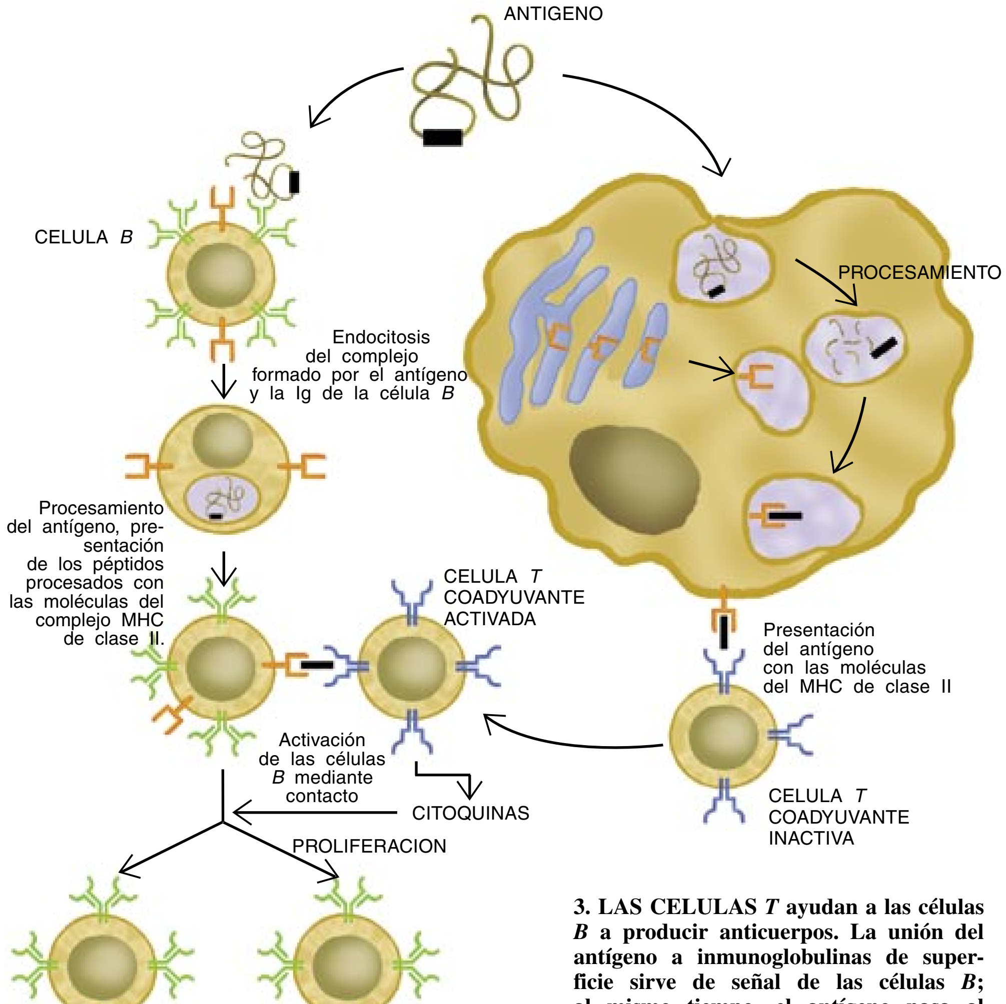
El pasado de la vacunación

La inmunidad adquirida contra la enfermedad, principio básico sobre el que se han desarrollado las vacunas, la reseñó ya Tucídides 430 años antes de la era cristiana. Al describir cierta epidemia que asoló Atenas (quizá de fiebre tifoidea), no se le olvidó señalar que los supervivientes no sufrían recidivas de la enfermedad y pudieron, por tanto, cuidarse de los afectados.

Las prácticas encaminadas a desencadenar inmunidad artificial frente a las enfermedades son también muy antiguas. La variolación, es decir, la transferencia de material infectado de una lesión de viruela a personas sanas para tornarlas resistentes a exposiciones subsiguientes a esta enfermedad mortal, se practicaba en el 590 a.C. en Asia, aunque no parece probable que se remontara muy atrás en el tiempo. En la Edad Media, este procedimiento se extendió a Persia, Turquía, Libia y Europa.

Pero su mayor difusión, acontecida a principios del siglo XVIII, se debió a Mary Montagou, esposa del embajador británico en Turquía. La dama, tras haber visto los milagros que dicha práctica obró en aquel país, decidió promoverla en Inglaterra. Su trabajo fue tan eficaz, que consiguió su generalización en Inglaterra, donde los hijos de la familia real fueron vacunados en 1722. Sin embargo, el procedimiento resultaba todavía bastante arriesgado; hasta un 4 % de las personas inoculadas podía desarrollar una forma grave de la enfermedad y morir. La solución final vino en 1796 de la mano de Edward Jenner, quien, mientras ejercía la medicina en un medio rural, había observado que los campesinos expuestos a material infectado de las vacas no desarrollaban la enfermedad, sino que adquirían inmunidad frente a la viruela. Decidió utilizar el material menos peligroso derivado de las lesiones bovinas (“vaccinus”) para “vacunar” a un chico (James Phipps) y demostrar su inmunización frente a un nuevo episodio de viruela.

Pero el planteamiento científico de la vacunación se demoró todavía un siglo. Es decir, hasta que Pasteur descubrió que las enfermedades infecciosas estaban causadas por microorganismos y utilizó el virus de la rabia inactivado. La vacunación a gran escala no comenzaría hasta que Ramon halló en 1924 una forma segura y reproducible de inactivación de las toxinas y los microorganismos patógenos, mediante su tratamiento con formaldehído, y después de conseguir la atenuación de los patógenos mediante pasos sucesivos en medios de cultivo *in vitro*. Con estas técnicas elementales, desde 1920 hasta 1980 se desarrollaron vacunas contra el tétanos, la difteria, la viruela, la poliomielitis, la tos ferina, el sarampión, la rubéola y el meningococo, que antes mataban centenares de millones de personas. En 1977, como consecuencia de un esfuerzo de vacunación coordinado por la Organización Mundial de la Salud, se consiguió la erradicación de la faz de la Tierra del virus de la viruela.



3. LAS CELULAS *T* ayudan a las células *B* a producir anticuerpos. La unión del antígeno a inmunoglobulinas de superficie sirve de señal de las células *B*; al mismo tiempo, el antígeno pasa al interior de las células presentadoras de antígeno profesionales, que lo degradan en péptidos y éstos se asocian con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II y activan a las células *T* coadyuvantes inactivas. El antígeno ligado y las señales de las células *T* coadyuvantes activadas provocan que las células *B* comiencen a multiplicarse y a diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

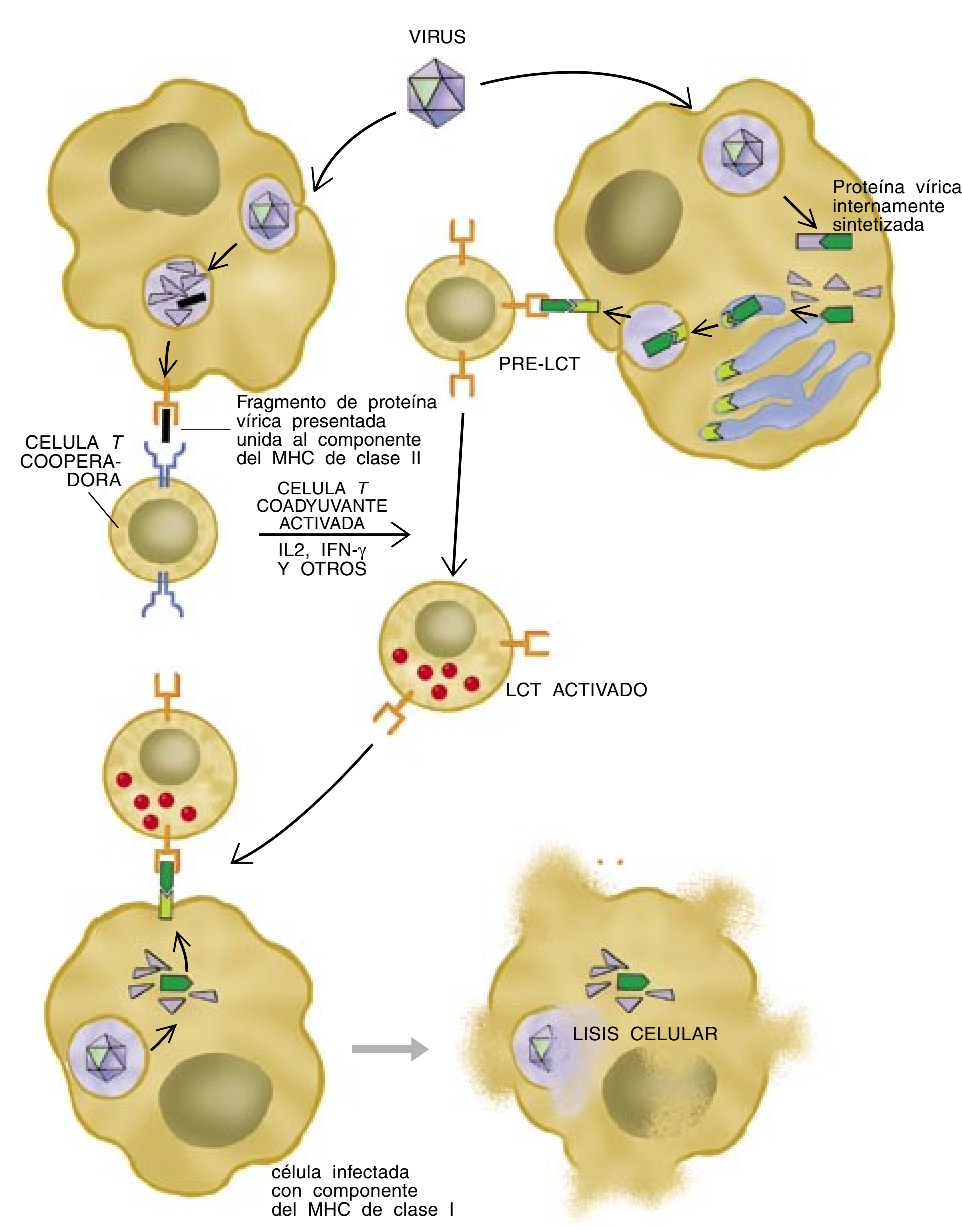
El presente

A mediados de los años setenta, se había sacado todo el partido posible de la técnica necesaria para el desarrollo de las vacunas, cuyo número había llegado al límite de acuerdo con los medios entonces disponibles. Pero las enfermedades infecciosas representaban la causa principal de defunción e, invirtiendo la tendencia al descenso de principios de este siglo, el índice de mortalidad se acentuaba (un aumento del 58 % desde 1980 hasta 1992 en EE.UU., donde las enfermedades infecciosas son la tercera causa principal de muerte en la actualidad). Aparecían el sida, el VHC, la enfermedad de Lyme y la colitis hemorrágica, al tiempo que retornaban enfermedades que se creía controladas (tuberculosis). Por último, el desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos hacía mucho más difícil y caro el control de la gonorrea, la enfermedad neumocócica, las infecciones estafilocócicas y enterocócicas, la tuberculosis y el paludismo, entre otras.

Resultaba, pues, apremiante, encontrar nuevas vacunas a partir de planteamientos novedosos. Y así, desde principios de los años ochenta, las industrias biomédicas empezaron a invertir en investigación en vacunas, aprovechando la técnica de ADN recombinante y el mayor conocimiento del sistema inmunitario. Tales empeños no fueron estériles. Nos ceñiremos a tres ejemplos que tipifican el nuevo derrotero.

La hepatitis B es una enfermedad vírica que mata cada año a dos millones de personas. El equipo de M. R. Hilleman, de los laboratorios Merck, había demostrado experimentalmente en 1976 la viabilidad de una vacuna contra el virus de esa forma de hepatitis (VHB); en efecto, la inyección de antígeno particulado purificado, procedente del plasma de personas infectadas, protegía a los animales de la infección por el VHB. La vacuna era eficaz, pero no podía producirse en grandes cantidades dada la limitación de donantes. La solución vino de la mano de la clonación del genoma del VHB y la expresión de las partículas del VHB en la levadura. En la Universidad de California en Berkeley, P. Valenzuela y W. J. Rutter consiguieron expresar en la levadura el gen que cifraba la proteína de superficie del virus. La manipulación genética de la levadura permitió producir elevadas cantidades del antígeno de superficie con la misma conformación que las partículas derivadas de los donantes de plasma. En la actualidad, la vacuna se administra a varios millones de personas en todo el mundo, la enfermedad está desapareciendo y cabe esperar que la insuficiencia hepática y el cáncer causados por esta infección pasen pronto a la historia.

El segundo ejemplo nos lleva a *Bordetella pertussis*, que se cobra la vida, cada año, de unos 350.000 niños. En los años cuarenta se desarrolló una vacuna constituida por células bacterianas completas muertas. Aunque presentaba un alto nivel de eficacia, su empleo estuvo siempre rodeado de polémica debido a su gran reactogenicidad. Además, y eso era lo peor, sus graves efectos secundarios no permitía la vacunación de niños mayores y adolescentes, quienes propagan el agente infeccioso, impidiendo así cualquier posibilidad de controlar la infección. Durante la investigación de vacunas subunitarias



4. PARENTESCO DE CLASE en la respuesta inmunitaria celular. Los linfocitos *T* precursores de las células *T* citotóxicas reconocen los péptidos de los patógenos intracelulares, sobre todo de los virus, unidos a los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos profesional. Las células *T* coadyuvantes, activadas por reconocimiento de los péptidos, y el complejo principal de histocompatibilidad de clase II proporcionan el medio óptimo, las citoquinas y los contactos para la maduración de los precursores citotóxicos de células citotóxicas efectoras que matan las células blanco infectadas.

VACUNAS EFICACES DISPONIBLES (1996)				
	FORMULACION DE LA VACUNA			
BLANCO	***Microorganismo completo***		***Subunidad de microorganismo***	
	Atenuado	***Muerto***	***Natural***	***Recombinante***
Adenovirus		+		
B. pertussis		+	+	+
C. diphtheriae			+	
H. influenzae			+	
Virus hepatitis A		+		
Virus hepatitis B			(+)	+
Virus de la gripe		+	+	
Virus sarampión	+			
Meningococo A			+	
Meningococo C			+	
Virus paperas	+			
Poliovirus	+	+		
Virus de la rabia		+		
Virus rubéola	+			
C. tetani			+	
S. typhi	+		+	
Virus varicela		+		

nuevas y más seguras, se observó que la toxina *pertussis* era el principal antígeno protector; había que detoxificar la molécula si se quería utilizarla de vacuna. ¿Cómo lograrlo? En los años setenta, J. A. M. Papehnheimer y J. Murphy, de Harvard, habían demostrado la modificación, mediante mutagénesis aleatoria, de un gen codificador de la toxina de la difteria; con ese cambio se producía una molécula inmunológicamente idéntica a la toxina, pero inocua.

Decidimos seguir esa vía, con una salvedad: en vez de recurrir a la mutagénesis aleatoria para crear un mutante, identificamos, mediante diseño molecular asistido por ordenador, los posibles aminoácidos implicados en la toxicidad. Empezamos por clonar el gen de la toxina de *B. pertussis* y, después de estudiar las relaciones estructura-función de la molécula en simulaciones informáticas, seleccionamos dos aminoácidos a sustituir por mutagénesis dirigida. La toxina producida mediante ingeniería genética era inactiva y mostraba una inmunogenicidad aproximadamente 10 veces superior que la molécula de tipo silvestre detoxificada por el tratamiento tradicional con formaldehído. Al probarla en ensayos de eficacia a gran escala, esta vacuna confería una excelente protección contra la enfermedad, que aparecía antes y duraba más que la inducida por las vacunas tradicionales, pese a la dosis utilizada de antígeno, muy baja. Por el descubrimiento de la primera vacuna de diseño, uno de nosotros (Rappuoli) recibió el premio Paul Erhlich y Ludwig Darmstaedter en 1991.

En 1996 se otorgó el premio Laskey al descubrimiento de la primera vacuna semisintética, constituida por el acoplamiento artificial de un polisacárido y una molécula proteica. Se las llama vacunas conjugadas. Se sabía que muchas bacterias causantes de infección sistémica están rodeadas por una cápsula de polisacáridos y que la vacunación con polisacáridos purificados podía proteger de la enfermedad. Desde hacía decenios existían vacunas de polisacáridos contra los pneumococos; en tanto que las dirigidas contra meningococos se introdujeron en los años setenta. Pero estas últimas, aplicadas a los adultos en tiempos de epidemia, no resultaron adecuadas para la prevención en masa de la enfermedad, ni para la vacunación de los lactantes, blancos principales de las enfermedades.

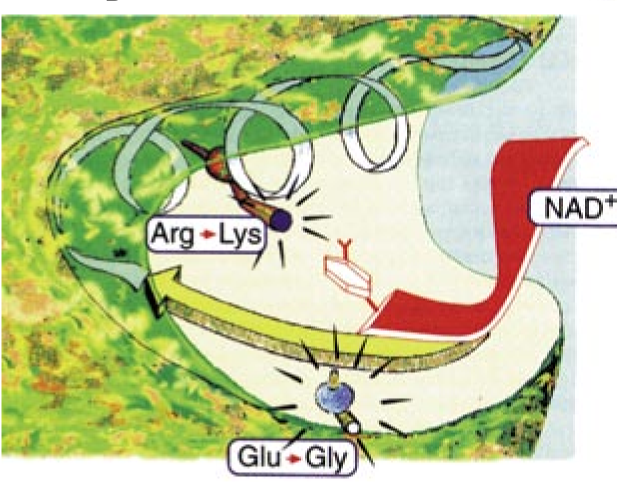
La explicación del fenómeno reside en las células *T* coadyuvantes, que reconocen muy mal los polisacáridos, si llegan a hacerlo. En consecuencia, sólo inducen una respuesta inmunitaria parcial a corto plazo e independiente de las células *T* en adultos, y no crean memoria. Para resolver esa limitación, se estableció una conjunción química entre el polisacárido y una proteína portadora (el toxoide de

A

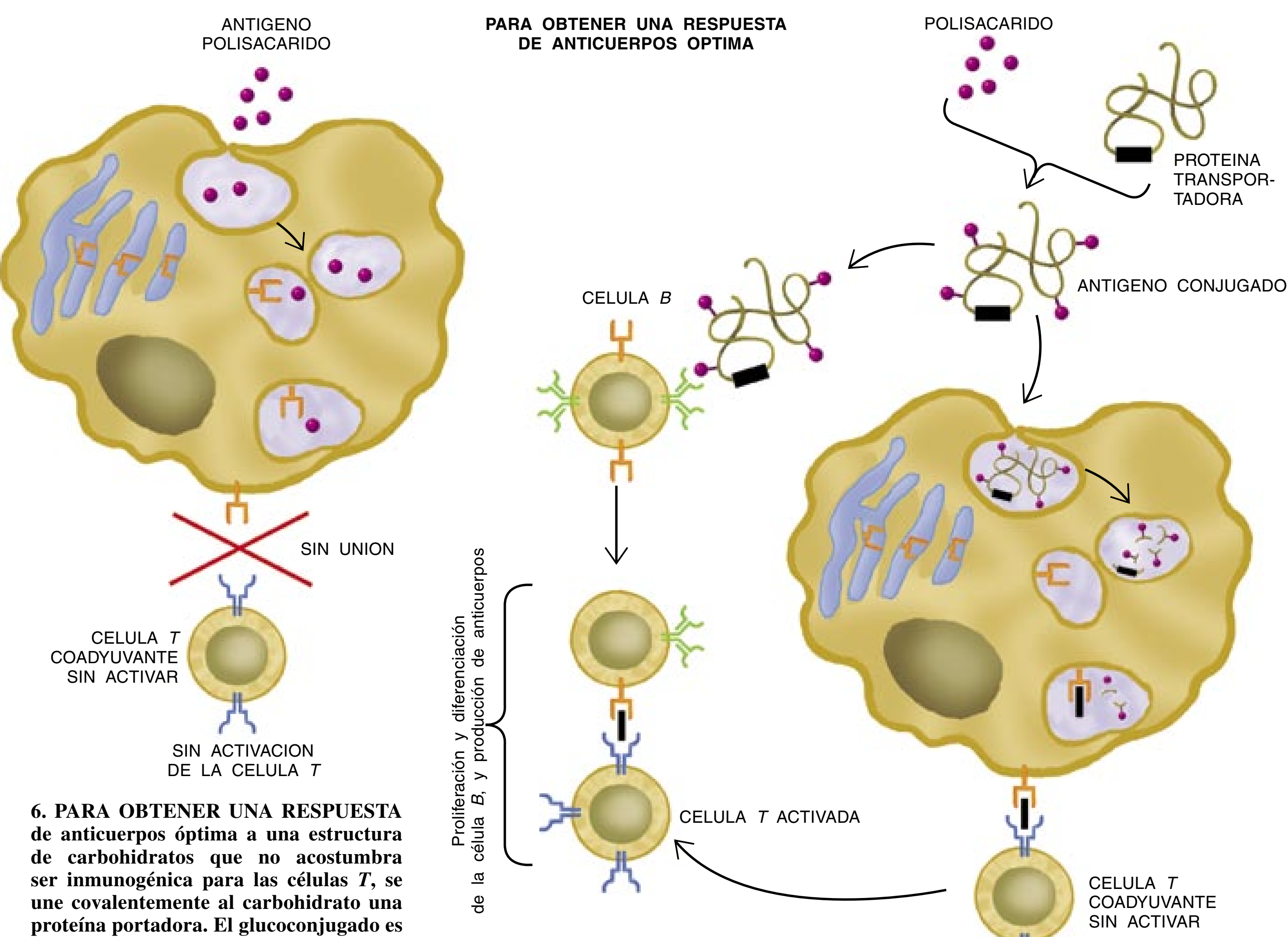
VIRUS DE LA HEPATITIS B
Hepadnaviridae
preS1
preS2
S
HBc
LHBs
RT
SHBs
3,2kb ADN
MHBs
TP
42 nm

PARTICULAS DEL Ag
DE SUPERFICIE DE LA HB
FILAMENTOS
LONGITUD VARIABLE
ESFERAS
17-25 nm

B



5. LAS DOS VACUNAS de subunidades recombinantes comercializadas. Aparecen en representación esquemática la partícula del virus de la hepatitis B y las partículas recombinantes del antígeno de superficie sintetizadas en levadura macho (*A*). En la ilustración del bolsillo catalítico de la toxina de *Bordetella pertussis* (*B*), se indica que los dos restos de Arg y de Glu se sustituyeron por mutagénesis lateral dirigida para crear una molécula genéticamente detoxificada con características inmunogenéticas intactas.



6. PARA OBTENER UNA RESPUESTA de anticuerpos óptima a una estructura de carbohidratos que no acostumbra ser inmunogénica para las células *T*, se une covalentemente al carbohidrato una proteína portadora. El glucoconjugado es procesado por las CPA, que presentan los epítopos de la proteína portadora a las células *T* coadyuvantes. Estas células *T* activadas ayudarán a las células *B* que han sido señaladas por la unión del carbohidrato e inmunoglobulinas específicas expuestas en la superficie.

la difteria o del tétano) que sí era reconocida por las células *T*.

A los pocos años de su uso, la primera vacuna de esta naturaleza desarrollada frente a *Hemophilus influenzae*, un patógeno que causa la meningitis en los lactantes, erradicó la enfermedad y la bacteria de todos los países en los que se había introducido. Basadas en el mismo principio se han creado vacunas contra *Meningococcus* A y C, *Pneumococcus* y *Salmonella typhi*, que están superando felizmente la fase de ensayo clínico.

El futuro

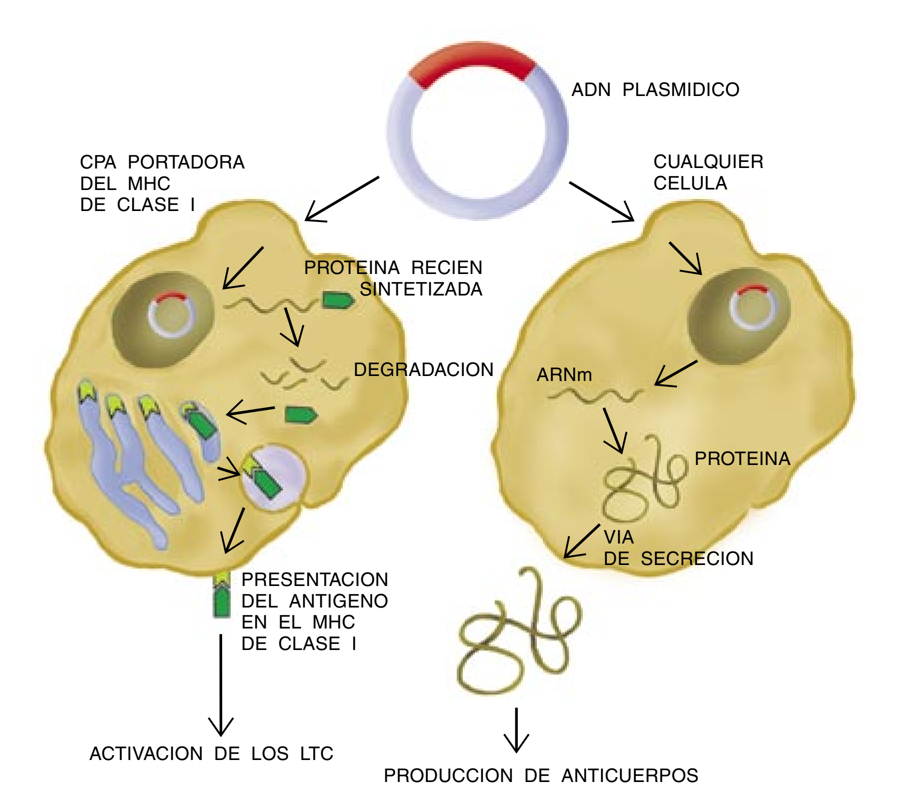
La era genómica proporcionará blancos para nuevas vacunas a un ritmo que aumenta de forma exponencial. En los años setenta secuenciar un gen era tarea imposible. En los ochenta, ya se podía, pero un equipo de investigación necesitaba un año para secuenciar un gen de unos 2000 pares de bases. Se requería, pues, un trabajo previo largo y esmerado para asegurarse de que el gen que se estaba secuenciando era candidato idóneo para la acción de la vacuna. Hoy el panorama es otro. En menos de seis meses puede secuenciarse un genoma bacteriano de unos tres millones de pares de bases; y, con ello, las proteínas aptas para considerarlas blanco de vacuna. Sirviéndonos de algoritmos especiales, podremos contar en cuestión de horas con la selección de las moléculas apropiadas.

Con la vista puesta en el futuro, se perciben tres áreas muy prometedoras: la administración de vacunas a través de las mucosas, las vacunas de ADN y las vacunas terapéuticas.

Empecemos por la administración a través de las mucosas. Salvo raras excepciones, las vacunas se administra mediante inyección intramuscular, un método anticuado. Todavía en los años sesenta ésta seguía siendo la forma común de aplicar los fármacos al uso; así se administraba el 80 % de los medicamentos importantes. Los laboratorios farmacéuticos han rebajado ahora esa cifra al 15 %, y se prefiere la vía bucal, mucosa o transdérmica.

Si en el dominio de las vacunas no se ha abandonado aún la inyección, débese en buena medida a los escasos márgenes que deja esa medicación. Pero los mayores réditos de la introducción de la biotecnología sí posibilitan el que se dedique dinero a la investigación de otros modos de administración.

El desarrollo de vacunas administradas a través de las mucosas no sólo supondrá una mayor comodidad en su aplicación, sino que, además, estimulará una respuesta inmunitaria en lugares de las mucosas que no suelen intervenir en la inmunidad desencadenada por las vacunas sisté-



7. LA INMUNIZACION CON ADN podría representar una forma más potente y eficaz de desencadenar respuestas inmunitarias. Las células absorben el ADN plasmídico y expresan el gen codificador del antígeno que interese. En este punto, el antígeno puede seguir dos rutas diferentes: *a*) puede ser secretado y, por tanto, inducir la producción de anticuerpos a la manera de las subunidades proteicas; *b*) puede ser procesado intracelularmente y los fragmentos antigénicos presentados en la superficie de la célula en el contexto de los componentes del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, estimulando así la respuesta de los linfocitos *T* citotóxicos.

micas. La superficie de las mucosas está expuesta al ambiente y suelen ser la primera barrera que encuentran los microorganismos patógenos durante la infección. Esa zona superficial abarca, en el organismo humano, unos 400 m^2.

Con objeto de luchar contra los microorganismos patógenos desde la misma puerta de entrada, y no sólo una vez localizados en el interior del organismo (inmunidad sistémica), el sistema inmunitario ha dispuesto un ejército particular en los tejidos mucosos. En este sistema intervienen tipos de anticuerpos diferentes (IgA en vez de IgG) y células *T* distintas que se alojan específicamente en los tejidos mucosos.

El desarrollo de vacunas de administración vía mucosa precisa, además de las técnicas de presentación del fármaco, el uso de coadyuvantes especiales. En efecto, los tejidos de las mucosas están expuestos de continuo a millones de sustancias inocuas a través de la comida, la bebida, la respiración y el contacto, entre otros medios, y han aprendido a despreocuparse de ellas. Por tanto, para que se reconozca su carácter patógeno y así alertar al sistema inmunitario, las sustancias deben presentarse unidas a coadyuvantes que faciliten su identificación; deben, asimismo, alcanzar determinadas células de la mucosa (células M).

No está claro todavía qué hace especiales a las moléculas para que las células de las mucosas las reconozcan como peligrosas o patógenas. Sin embargo, algunas moléculas tienen la virtud de estimular el sistema inmunitario mucoso; podríamos mencionar entre ellas a la toxina colérica (TC) y la toxina termolábil (TL) de *Escherichia coli*. Cuando estas moléculas tóxicas se administran por vía oral o intranasal, provocan una respuesta inmunitaria poderosa contra ellas y contra las moléculas con las que se administran conjuntamente. ¿Podríamos eliminar la toxicidad de esas moléculas sin afectar a la capacidad del sistema inmunitario para reconocer su naturaleza tóxica?

Descubrimos que las toxinas TC y TL mutantes, a las que habíamos eliminado su toxicidad por ingeniería genética, seguían, no obstante, desencadenando la respuesta del sistema inmunitario mucoso. En 1995, en colaboración con G. Dugan, del Colegio Imperial de Londres, nos aprestamos a inmunizar ratones contra la toxina tetánica utilizando un pulverizador nasal. Añadimos unos pocos microgramos de una forma mutada de la TL a una preparación de toxina tetánica químicamente detoxificada; administramos el compuesto en las cavidades nasales de los ratones. Transcurridas unas semanas de la inmunización, se inyectó en cada ratón inmunizado una cantidad de toxina tetánica activa suficiente para matar 10 ratones: los que habían sido inmunizados estaban protegidos y sobrevivieron muy bien a la provocación con la toxina.

Vacunas de ácidos nucleicos

El desarrollo y la fabricación de las vacunas, tradicionales o recombinantes, precisan técnicas refinadas, que van desde la preparación a gran escala de microorganismos patógenos hasta su formulación en una vacuna, pasando por su inactivación y purificación de estructuras complejas. A veces resulta muy difícil, si no imposible, conseguir el crecimiento *in vitro* de los patógenos.

Investigadores de los laboratorios Merck y Vical han llegado hace poco a un descubrimiento de largo alcance. Insertaron en un plásmido bacteriano el gen que codifica la nucleoproteína (NP) del virus A de la gripe junto con elementos reguladores de la transcripción y la traducción en eucariotas. Al inyectar el plásmido por vía intramuscular en ratones, se desencadenó una fuerte respuesta inmunitaria contra la nucleoproteína. De ello se infería que el ADN había penetrado en las células (transducción *in vivo*) y se había expresado. Todavía más: los ratones inmunizados con el ADN de la NP sobrevivieron a una provocación subsiguiente con el virus de la gripe. Bastaba, pues, la simple administración del ADN codificador de un solo antígeno específico del virus para reproducir los efectos protectores obtenibles mediante la vacunación con virus muertos o atenuados.

Indicios de la posibilidad de la transducción *in vivo* por inyección de ADN purificado habían aparecido mucho antes. Nadie, sin embargo, les había prestado atención suficiente. En 1960, Y. Ito publicó un artículo donde demostraba la inducción de

papilomas en la piel de conejo mediante la inyección de ácidos nucleicos extraídos con fenol del virus del papiloma de conejo Shope. Treinta años más tarde, el equipo dirigido por J. A. Wolff, de la Universidad de Wisconsin, observaban que la inyección del ADN del plásmido portador del gen de la β-galactosidasa se traducía en la expresión de la actividad enzimática dentro del músculo esquelético. El ADN del plásmido pudo detectarse 30 días después mediante la técnica de hibridación de Southern ("Southern Blot") y la actividad enzimática persistió al menos durante 60 días después de la inyección.

En 1992, el equipo de D. Tang, de la Universidad de Texas, demostró que la inyección intramuscular del plásmido no sólo permitía la expresión del gen pertinente, sino que, además, el nivel de expresión desencadenaba una respuesta inmunitaria. Cuando se inyectó un plásmido que albergaba el gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) bajo el control transcripcional del promotor β-lactina humana o del CMV, se detectaron, una semana más tarde, anticuerpos anti-hGH en los sueros de los ratones inmunizados. Además, se observaron efectos de refuerzo de la inmunización subsiguiente con ADN, de forma similar a los que suelen aparecer tras la inmunización con proteínas.

Por último, el aludido trabajo con la nucleoproteína del virus A de la gripe puso de manifiesto que la respuesta inmunitaria inducida por la inyección de un plásmido podía ser protectora, poniendo así de manifiesto la capacidad del ADN plasmídico como vacuna.

El descubrimiento de los científicos de Merck y Vical, publicado en *Science* en 1993, promovió una intensa actividad investigadora, lo mismo en la universidad que en la industria. A unos les interesaba la base celular e inmunitaria de la vacunación con ADN; a otros, el filón de productos inéditos que suponía el dominio de la nueva técnica.

Aunque no acaba de entenderse el porqué de la respuesta inmunitaria protectora tras la inyección del ADN, sí se sabe ya que, una vez inyectado, el ADN del plásmido atraviesa las membranas de las células musculares y de las células del sistema inmunitario y llega a su núcleo. Aquí, el plásmido no puede multiplicarse, debido a la ausencia de señales de replicación eucarióticas, ni integrarse en el cromosoma huésped, dado que no existe homología de secuencia entre los ADN cromosómico y plasmídico. Sin embargo, el gen codificador del antígeno, gracias a la presencia de señales reguladoras adecuadas, puede transcribirse en ARNm y traducirse luego en proteínas con eficacia suficiente para poner el sistema inmunitario en jaque.

Desde una perspectiva industrial, la vacunación con ADN simplificaría los procesos de producción de las vacunas. No habría que preparar y purificar el antígeno de la vacuna, una tarea carísima y dura. Los laboratorios farmacéuticos podrían dedicarse al diseño y purificación de plásmidos. Desde el punto de vista de la respuesta inmunitaria a las vacunas, el recurso al ADN podría representar una forma más potente y eficaz de avivar al sistema inmunitario y de combatir enfermedades infecciosas contra las cuales han fracasado las vacunas tradicionales.

Los antígenos que constituyen las vacunas subunitarias o los microorganismos muertos llegan al interior celular por fagocitosis o endocitosis; se procesan a través de la vía del MHC de clase II. Así activan las células *T* coadyuvantes; éstas, a su vez, estimulan la respuesta humoral de síntesis de anticuerpo y la respuesta inflamatoria.

Las vacunas de ADN permiten, por contra, la entrada de los antígenos en las dos vías del MHC, la de los componentes de clase I y la de los componentes de clase II y, por consiguiente, pueden desencadenar todas las respuestas efectoras del sistema inmunitario, es decir, anticuerpos, células responsables de la inflamación y células *T* citotóxicas.

Se están llevando a cabo estudios de inmunización con ADN de un gran número de agentes infecciosos en modelos de micromamíferos. Pero se desconoce aún la eficacia de la administración del ADN en primates. De hecho, se precisan grandes cantidades de ADN para estimular respuestas inmunitarias apreciables en monos, sin olvidar que necesitamos más información básica sobre los mecanismos de captación del ADN *in vivo* y sobre el papel de los diferentes tipos de células transfectadas en la inducción de la respuesta inmunitaria.

Algo se va despejando con la prometedora información sobre la protección de chimpancés contra el virus de la hepatitis *B* y el VIH mediante inmunización con ADN. Se ha entrado en la fase de ensayos provisionales en voluntarios humanos de la inmunización contra el virus de la gripe, el VIH y el paludismo. No tardaremos mucho en conocer si la inmunización con ADN abandona la lista de "técnicas potencialmente útiles" para engrosar el magro elenco, por privilegiado, de "técnicas valiosas desde el punto de vista social y económico".

LA REVOLUCION GENOMICA

Año 1975	Imposible la secuenciación del ADN.		
Año 1977	Secuenciación manual. Método de Maxam y Gilbert; método de Sanger.	Período de "comprobación de la hipótesis".	
Año 1982	Secuenciación manual. Método de Sanger.	Factible la secuenciación de genes.	Aproximadamente 2000-3000 nucleótidos en un año.
Año 1995	Secuenciación automática.	Factible la secuenciación de genomas.	1 genoma bacteriano (3 millones de nucleótidos) en 6 meses.
Año 1997	Secuenciación automática y tecnología. de microchip.	Ensayo de secuenciación genómica.	1 genoma bacteriano en 30 minutos.

Vacunas terapéuticas

Además de prevenir una enfermedad, ¿puede una vacuna curarla? ¿Podremos valernos de la vacunación para educar a nuestro sistema inmunitario con el objeto de erradicar enfermedades ante las cuales la medicina al uso sólo puede aportar remedios transitorios? Estamos pensando en infecciones crónicas, tumores, alergias u otras enfermedades autoinmunitarias.

Bajo la esperanza del recurso terapéutico a las vacunas subyace la idea de que el sistema inmunitario del huésped puede, por sí mismo, elaborar una respuesta capaz de controlar o erradicar una enfermedad determinada. Son ejemplos típicos algunos tumores. Aunque casi todos los tumores son antigénicos, es decir, expresan moléculas que el sistema inmunitario del huésped puede reconocer, hay muy pocos que sean también inmunogénicos, capaces de provocar una respuesta inmunitaria detectable en los pacientes contra ellos. Este es el motivo de que el sistema inmunitario no pueda, por lo común, controlar el crecimiento tumoral.

Se han seguido dos estrategias principales para diseñar vacunas tumorales. Una se basa en la identificación de los antígenos asociados a los tumores (AAT), con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria contra ellos. La segunda estrategia consiste en aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales; por ejemplo, mediante la creación de un entorno inflamatorio en los lugares donde se encuentra el tumor o proporcionando en forma soluble las moléculas coestimuladoras ausentes de las células *T*. Se encuentra ya en fase avanzada de ensayo clínico el tratamiento del melanoma con vacunas.

En la infecciones crónicas, recordemos la provocada por el virus de la hepatitis B (VHB), la situación es distinta. En estos casos, el sistema inmunitario responde a la infección, pero sin la intensidad suficiente para erradicarla. Aún peor, como ocurre con el VHB, la respuesta inmunitaria desencadenada contra la infección causa la enfermedad: las células *T* dañan al hígado infectado en su empeño por eliminar el virus. Aquí, la estrategia de desarrollo de una vacuna terapéutica consiste en enseñar al sistema inmunitario para que responda al ataque del agente infeccioso de una manera beneficiosa para el huésped, y no deletérea. En el caso concreto del VHB, se busca generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes y evitar las reacciones citotóxicas.

Se trabaja en la preparación de vacunas contra la infección por herpes genital (VHS-2), hepatitis B (VHB) y C (VHC), papilomavirus (PVH), *Helicobacter pylori* (HP) y VIH. A la mayoría de esas infecciones crónicas se les ha atribuido un efecto tumorígeno de los órganos infectados, por ejemplo, el VHC y el hígado, HP y el estómago, el PVH y los órganos genitales, el VHS y el útero. Por tanto, amén de curar la infección crónica, disminuiría con la vacuna el riesgo de tumoración.

En el caso de las enfermedades autoinmunitarias o de las alergias, lo que se pretende es suprimir la respuesta inmunitaria patógena. Se supone que el curso de las enfermedades autoinmunitarias puede modificarse por supresión de las células patógenas (normalmente Th1-CD4+ o CTL-CD8+, células *T*) o por alteración de su función efectora. Cabe suponer que el cambio de la función efectora de las células Th1 en células Th2 comportará la resolución de la inflamación crónica que se produce en los lugares de enfermedad autoinmunitaria. Lo contrario ocurriría en las alergias, en las que el cambio de la función efectora de las células Th2 alérgicas en células Th1 podría acarrear el alivio de las reacciones alérgicas.

En resumen, el término vacunación no remite ya obligadamente a una medida preventiva. Va decantando su significado hacia cualquier procedimiento que inste o pergeñe respuestas inmunitarias buscadas, con independencia de que se evite así una infección o se modifique el curso de una enfermedad contraída.

La biotecnología ha proporcionado un potencial ilimitado para el desarrollo de nuevas vacunas y, con ello, se ha ampliado el campo de acción de la vacunación.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

MEDICAL MICROBIOLOGY. Dirigido por Mins, Playfair, Roitt, Wakelin y Williams, Mosby, 1993.

CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY. Dirigido por A. K. Abbas, A. H. Lichtman, J. S. Pober. W. B. Saunders Company, 1994.

BACTERIAL PATHOGENESIS: A MOLECULAR APPROACH. Dirigido por A. A. Salyers y D. D. Whitt, ASM Press, Washington, D. C., 1994.

Nuevas formas farmacéuticas

Modificando tiempos y tipos de liberación de los medicamentos, podemos aumentar su eficacia y, a la vez, reducir la dosis de principio activo

Alberto Frigerio y Francesca Bodega

Programar de manera óptima las dosis y mejorar la farmacocinética y la farmacodinámica de un principio activo ya conocido son aspectos de importancia similar en la puesta a punto de un nuevo fármaco. Para alcanzar estos objetivos se han estudiado formas de liberación modificada, en las que los sistemas que regulan la cesión del principio activo garanticen diversas cinéticas de liberación del fármaco. Se trata, según los casos, de mantener constantes los niveles hemáticos, retardar la liberación (o también acelerarla) y alcanzar los mismos efectos con una dosis menor.

El desarrollo experimentado por la ciencia de los polímeros (los materiales más empleados en este campo), la técnica farmacéutica y la biología ha contribuido al rápido avance de nuevos sistemas de liberación modificada.

Estas formas pueden considerarse, con razón, los fármacos del futuro, pues por sus características permiten maximizar las propiedades terapéuticas de las moléculas activas y reducir sus eventuales efectos secundarios. Consíguese tal fin mediante la liberación lenta y constante del principio activo, dirigido específicamente hacia el órgano a tratar, reduciéndose con ello efectos no deseados sobre otros órganos. Para ello es frecuente que se utilicen vías de administración alternativas, que, gracias a la eliminación del metabolismo de la primera pasada, permiten incrementar la cantidad de fármaco puesta en circulación sin dañar el aparato gastrointestinal u otros.

Las ventajas de tal enfoque son evidentes. Los sistemas de liberación modificada aumentan la eficacia del fármaco, permiten la utilización de principios activos que no se prestan a tomarse por vía oral y acostumbran resultar más económicos que los procedimientos tradicionales. Abaratan el proceso porque reducen la duración de la terapia, gracias a la mayor eficacia y a la mayor adaptabilidad; en algunos casos, es suficiente una cantidad menor de principio activo a emplear. El balance coste-beneficio resulta, por tanto, muy favorable.



1. LA PIEDRA DE BEZOAR es una concreción calculosa que se forma en el estómago de los rumiantes. Antaño, pulverizada en vino, servía de antídoto contra todos los males. Se creía también que curaba utilizándola como amuleto.

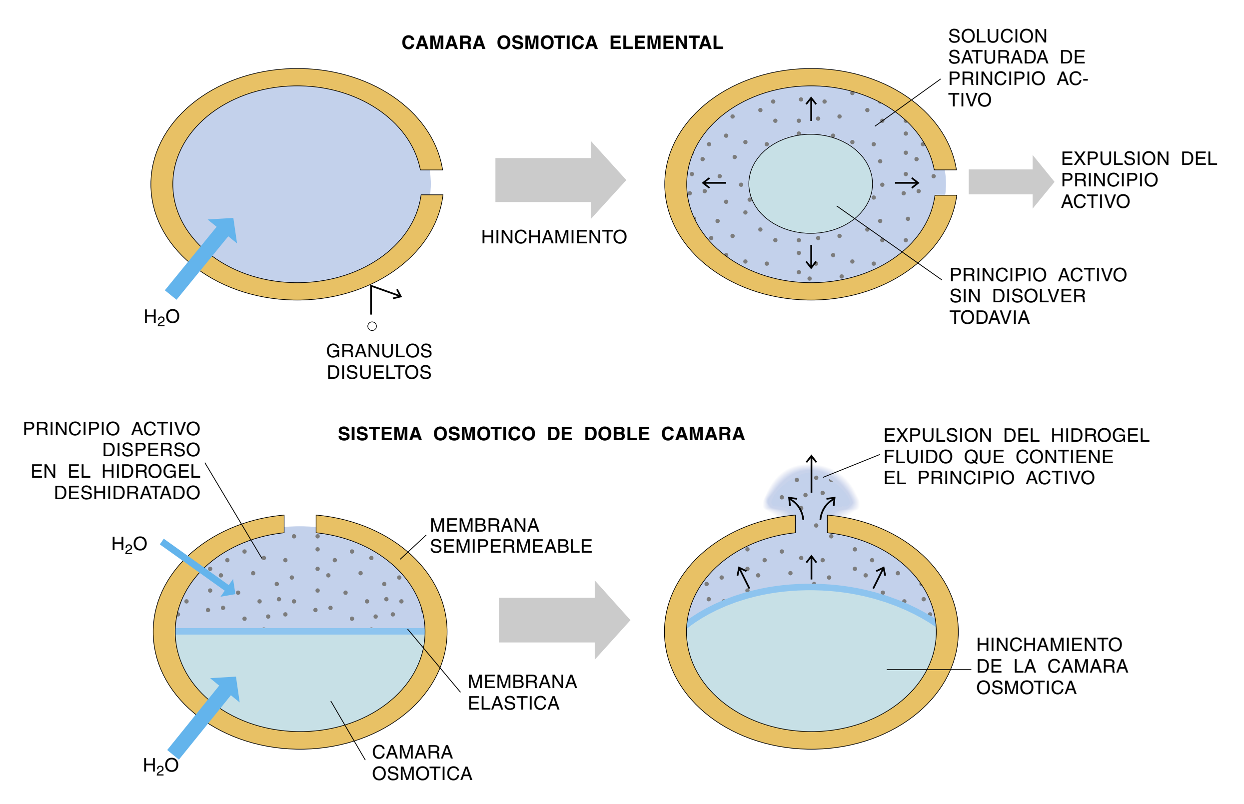
La normativa europea y estadounidense

Las formas de liberación modificada se caracterizan por su complejidad. De ahí que se requieran especiales cautelas que garanticen la previsibilidad y la reproducibilidad del sistema y eviten casos de sobredosis o de rechazo del fármaco. Según refiere Vittorino Ravelli, de la compañía Pharmatec International, el registro de los fármacos de liberación modificada se regula substancialmente, tanto en la Unión Europea como en los EE.UU., por la misma normativa que rige la de los fármacos tradicionales. Pero, a menudo, estos productos presentan situaciones, modalidades y tiempos de liberación diferentes de los de otras formas farmacéuticas, y utilizan ingredientes y procesos productivos no siempre descritos en las farmacopeas. Además, su potencial peligrosidad puede ser mayor, por un doble motivo: para reducir el número de tomas diarias contienen elevadas dosis de principio activo y, por otro lado, interactúan con el organismo de maneras muy complejas, desconocidas en buena medida.

En la Unión Europea existen normas y directrices claras sobre la liberación modificada. Se contemplan en ellas el protocolo del desarrollo farmacéutico, la prueba de disolución *in vitro*, los estudios de biodisponibilidad, los ensayos clínicos y la investigación de la correlación *in vivo-in vitro*, entre otros aspectos. No difiere mucho la situación norteamericana, aunque es algo más restrictiva.

Nuevas fórmulas para la vía oral

Los procedimientos técnicos habituales para modular la liberación de los fármacos administrados por vía oral se reducen a tres grandes grupos: matrices hidrófilas, sistemas multiparticulados y dispositivos osmóticos. Estos últimos se valen de la propiedad de las membranas semipermeables que consiste en dejar pasar el agua, pero no otros solutos. Así, un comprimido constituido por un núcleo que contenga un fármaco osmóticamente activo y revestido de una membrana semipermeable (por ejemplo, una membrana de acetato de celulosa), puesto en un ambiente acuoso, reclama agua del exterior; por



2. ESQUEMA del funcionamiento de algunos dispositivos osmóticos.

ser rígida la membrana, el aumento de la presión hidrostática dentro del comprimido hace que, por un poro practicado en su revestimiento, salga una solución saturada de principio activo. Este sencillo dispositivo, patentado con el nombre de Oros® y que se empleó para la liberación controlada de indometacina, se ha utilizado en la administración de nifedipina, fenilpropanolamina, pirazosín, salbutamol y otros fármacos.

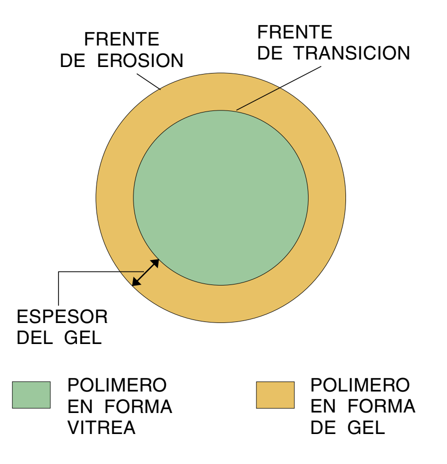
La evolución de los dispositivos osmóticos va encaminada hacia el establecimiento de sistemas que admitan el empleo incluso de fármacos poco solubles. Tal es el caso de las membranas compuestas, constituidas por una capa microporosa bastante espesa, capaz de ofrecer resistencia mecánica, recubierta de una sutil capa semipermeable, que forma la membrana osmótica; la membrana permite crear un elevado flujo de agua hacia el interior del comprimido, con lo que se logra una liberación suficiente incluso de fármacos poco solubles y, por tanto, con baja presión osmótica; añadiendo carbonatos o bicarbonatos en la cámara del fármaco se consigue que la acción efervescente por ellos generada evite la precipitación de los fármacos poco solubles, que podría obstruir el orificio por el que el fármaco sale del sistema. Mediante la adición de tampones, se puede controlar la solubilidad de los fármacos.

Cabe también recurrir a dispositivos osmóticos bicamerales, separadas las estancias por una barrera elástica o móvil. En una cámara se aloja el principio activo, finamente disperso en un hidrogel que, al contacto con el agua, se fluidifica y puede así salir con facilidad por el orificio; en la otra cámara, la osmótica, hay una solución osmóticamente activa. La presión que se genera al entrar el agua en la cámara osmótica empuja la membrana hacia la cámara que contiene el principio activo y fuerza la salida de éste.

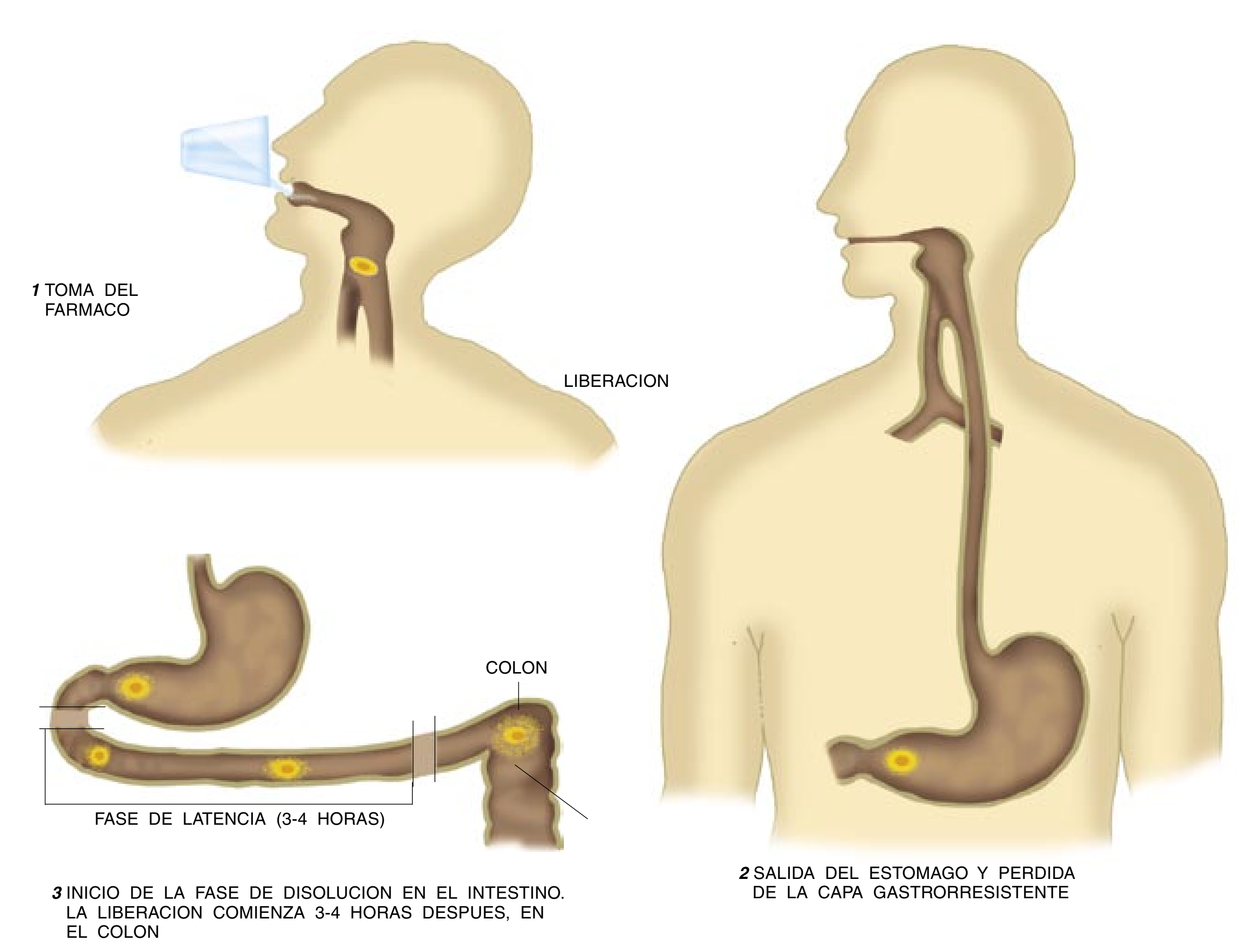
También se pueden utilizar dispositivos osmóticos bicamerales para diluir la solución del principio activo antes de su liberación o para liberar a un mismo tiempo dos principios activos.

Un problema técnico que se presenta a menudo en la fabricación de dispositivos osmóticos es el de la perforación del poro de salida con láser. Para obviar esa dificultad, algunos laboratorios farmacéuticos han creado un sistema de autoproducción de los poros. El revestimiento exterior contiene partículas que al contacto con el agua (o con determinados valores de *p*H) se disuelven y dejan en su lugar minúsculos orificios.

El interés que la técnica de la liberación controlada ha puesto en las matrices hidrófilas tiene que ver con la posibilidad de modularla a voluntad; de acuerdo con las necesidades,



3. REPRESENTACION esquemática de un sistema de matriz hidrófila. El frente de difusión se desplaza hacia el interior conforme el polímero va adquiriendo consistencia de gel, con el espesamiento consiguiente del estrato de difusión. El frente de erosión procede hacia el exterior cuando predomina el fenómeno de hinchamiento, para avanzar hacia el interior cuando prevalece la disolución. El movimiento relativo de estos dos frentes determina las dimensiones del estrato de difusión.



4. Liberación de un principio activo a través del sistema Chronotopic®.

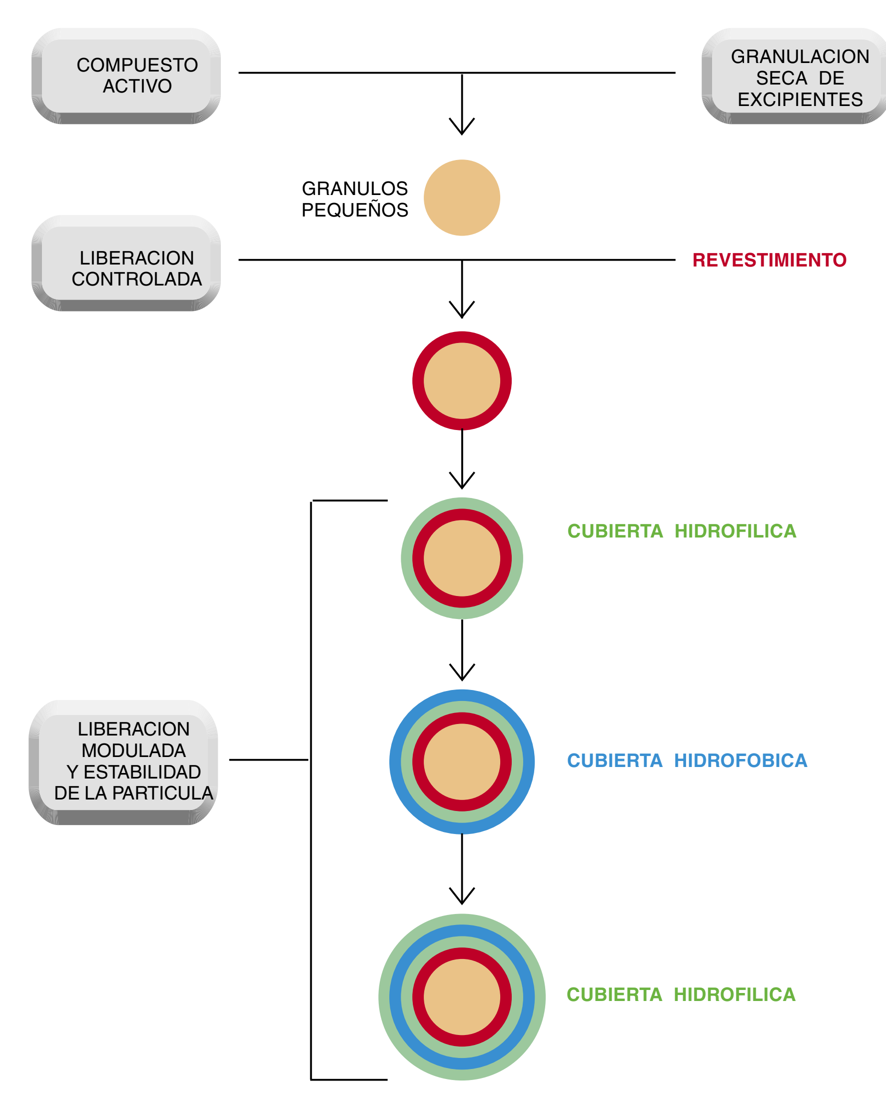
se consigue una segregación continua, retardada o con intermitencias sin variar la composición de la matriz. Basta con controlar el espesor de la capa de gel.

Los sistemas de matrices hidrófilas acostumbran presentarse en forma de comprimidos, donde el fármaco está disperso en un excipiente polimérico hidrófilo. Al contacto con los fluidos biológicos se forma una capa de polímero gelificado sobre la superficie externa, a través de la cual puede difundirse libremente el principio activo. El espesor de esta capa (capa difusiva) varía según la fracción de polímero en estado de gel, su hinchamiento (relacionado con las variaciones de la estructura química) y la disolución del gel por progresiva hidratación. El predominio de uno u otro fenómeno determina que aumente o disminuya el espesor de la capa difusiva, con el cual está corelacionada la velocidad de liberación del principio activo. Cuando ese trío de fenómenos se equilibran entre sí, el espesor permanece constante y puede originar una cinética de liberación de orden cero.

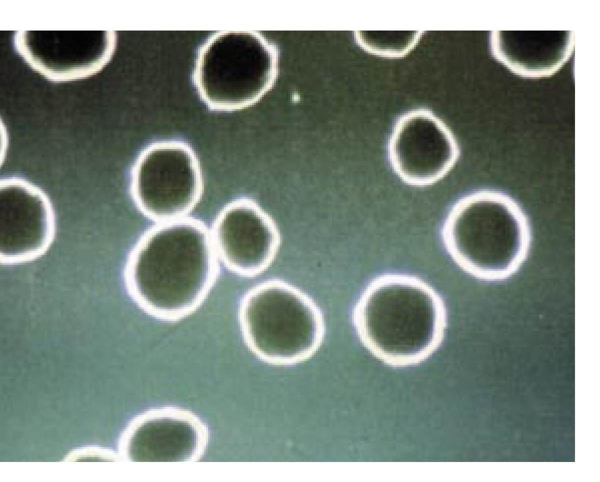
Matrices hinchables son, por ejemplo, las de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En ellas, el control del espesor de la capa difusiva se logra mediante el uso combinado de grados poliméricos de diversa viscosidad y de micelas de la HPMC con otros polímeros hidrófilos, o también con determinadas técnicas de fabricación, como la doble compresión y el revestimiento, que reduce la posibilidad de hinchamiento del polímero.

En formulaciones recientes intervienen sistemas con cinéticas de tipo pulsante y de tipo retardado. Entre los primeros, el sistema Pulsincap®, patentado por la estadounidense Scherer DDS Ltd., en el que el cuerpo de la cápsula está revestido de material soluble y cerrado con un tapón de material gelificable. En esta preparación, la cabeza de la cápsula, hecha de gelatina, se disuelve en agua, lo que permite al tapón gelatinoso hincharse y salir del cuerpo, liberando una sola dosis de principio activo.

Las cinéticas de liberación de tipo retardado se caracterizan por una fase de espera (*lag-time)* que precede a la secreción del principio activo. Una aplicación interesante es la del Chronotopic®, sistema de cesión retardada puesto a punto por el grupo de Andrea Gazzaniga, utilizado para dirigir hacia el colon la liberación del principio activo. Este sistema podría tener sentido en el tratamiento de infecciones locales o para aumentar la disponibilidad sistémica de polipéptidos suministrados por vía oral. Consta de un núcleo, que contiene en su interior el principio activo y está revestido de un polímero hidrófilo de HPMC, el cual garantiza la liberación retardada del fármaco tras un período de tiempo regulable en función de su naturaleza y espesor. Un segundo revestimiento gastrorresistente (soluble a *p*H mayor de 5) posibilita el tránsito del estómago al intestino para iniciar el proceso de disolución-gelificación de la capa interna. Con esa estrategia podemos programar la liberación del fármaco



5. REPRESENTACION ESQUEMATICA de la estructura de un gránulo producido con la técnica CRSS® (*Controlled Release Suspension System*). Estos gránulos, como son de dimensiones muy reducidas, pueden mantenerse en suspensión, lo que permite formular fármacos de liberación modificada en forma líquida.



6. GRANULOS que contienen teofilina producidos con técnica CRSS®. Se distinguen las capas del revestimiento. Los gránulos, de 200-300 micras de dimensión, presentan un alto grado de uniformidad en cuanto a figura y tamaños.

exactamente en el tramo deseado del tracto digestivo.

Aunque la mayoría de las formas de liberación modificada que se toman por vía oral lo son en forma sólida (cápsulas o comprimidos), para algunas clases de pacientes, como los ancianos o los niños pequeños, ofrecen indudables ventajas las formas líquidas. La técnica CRSS® (*Controlled Release Suspension System*), presentada por Giancarlo Santus, de la Recordati S.p.A., permite extender a numerosos fármacos la administración por vía oral. El principio activo, en forma de microgránulo, está revestido de un sistema filmógeno multiestrático constituido por un polímero dependiente del *p*H. Los revestimientos en que se alternan materiales hidrófobos e hidrófilos, además de modular el ritmo de segregación, garantizan la estabilidad de la suspensión a lo largo del tiempo.

Entre las técnicas más recientemente introducidas han suscitado interés las que utilizan matrices bioadhesivas para aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en correspondencia con las mucosas. Actualmente se halla en fase de experimentación una nueva fórmula en la que un inhibidor de la pepsina, que previene de la degradación gástrica a los péptidos tomados por vía oral, se enlaza covalentemente a la matriz bioadhesiva. Podrán así administrarse por vía oral péptidos que tienen por diana la mucosa gástrica, como el factor del crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*) empleado en el tratamiento de la úlcera. Las matrices bioadhesivas habituales son la carboxilmetilcelulosa y los metacrilatos; pero el interés por este sector ha hecho que se estudien nuevos sistemas. Y hay en fase de experimentación un sistema de superficie renovable constituido por partículas de polímero bioadhesivo dispersas en material lipídico.

Vías de administración alternativas

Los sistemas bioadhesivos se utilizan a menudo en la administración por vía oral. Desde el punto de vista de la absorción de los principios activos, la mucosa bucal se comporta como la gastrointestinal, con una buena permeabilidad junto con una rica vascularización. Pero ofrece además indudables ventajas sobre la mucosa gastrointestinal: baja actividad enzimática, buena accesibilidad y posibilidad de evitar el metabolismo del primer paso. Las desventajas vienen determinadas por su exigua superficie de intercambio. Las matrices bioadhesivas habituales son de hidrocoloides que se erosionan y presentan una estructura que puede variar desde simples discos bioadhesivos a sistemas laminares más complejos. Un límite de su eficacia son las dimensiones máximas obtenibles (entre los 10 y los 15 centímetros cuadrados), que están por debajo de las que serían óptimas.

Ventajas parecidas a las que pueden conseguirse en la administración de fármacos por vía oral se dan también en la administración transdérmica; después de los primeros emplastos con escopolamina y nitroglicerina, que tuvieron gran éxito comercial, las actividades relativas a la puesta a punto de nuevos sistemas terapéu-

La importancia de los excipientes

En la composición de un fármaco se distingue entre los principios activos, responsables de la acción terapéutica, y los excipientes, a los que tradicionalmente se les asignaba la función de “empaquetar” el principio activo para facilitar su administración.

Pero hoy quedan ya lejos los tiempos en que el término ‘excipiente’ significaba sustancia inerte sin efecto farmacológico. En la actualidad se prefiere tener a estas sustancias por coadyuvantes. Porque, según numerosos datos científicos, está claro que, además de influir en las características organolépticas y en la acomodación al paciente y de incrementar la estabilidad, la precisión y el acierto de las dosis, el excipiente desempeña un importante papel al determinar la acción terapéutica del producto final.

La elección del excipiente más idóneo deberá ser, pues, un momento esencial en la formulación de un producto farmacéutico. A este propósito, no es suficiente con conocer las propiedades físico-químicas de la sustancia en cuestión, sino que se precisa un estudio que ponga de manifiesto las interacciones del fármaco y el excipiente, así como todas sus posibles incompatibilidades, para que no se den luego problemas de estabilidad y, por ende, de conservación del fármaco. Tales investigaciones se realizan durante las fases que preceden a la formulación del fármaco y se valen de instrumentos analíticos rápidos y eficaces, como son los métodos de análisis térmico y las pruebas de estabilidad.

No menos necesaria es una valoración atenta, en función del tipo de excipiente, de las técnicas más aptas que hayan de emplearse durante el proceso de producción.

También, desde el punto de vista toxicológico, la atribución de la expresión “farmacológicamente inerte” exige una cuidadosa ponderación, para evitar que se produzcan efectos secundarios. Baste con recordar el dramático caso del glicol etilénico, que se empleó como diluyente en los sulfamídicos suministrados en forma de jarabes por los años 1937-1938 y causó la muerte de más de 200 personas.

Las muchas clases de excipientes nuevos de que se dispone hoy día representan un instrumento muy importante en manos del experto de laboratorio, al cual corresponde el deber de elegirlos con sumo cuidado y de someterlos a todos los controles que son esenciales para garantizar una auténtica mejora de la calidad del fármaco.

—Alberto Frigerio y Francesca Bodega



ticos transdérmicos (STT) se han intensificado mucho. Contamos ya con más de 20 tipos de STT, que contienen dinitrato isosórbido, estradiol, fentanil y nicotina. Y acaba de introducirse un nuevo emplasto contra la osteoporosis, mientras que está en fase de experimentación un STT que contiene un D2 antagonista de la dopamina, indicado para combatir la enfermedad de Parkinson.

El interés de la investigación en este sector se orienta hacia nuevos métodos que faciliten la penetración del fármaco a través de la capa córnea de la piel. Se propone reducir al mínimo los efectos secundarios representados por fenómenos de irritación y cambios irreversibles en la estructura de la piel. Los procedimientos químicos se basan en el empleo de promotores, sustancias que, actuando principalmente sobre la matriz lipídica de la capa córnea, facilitan la permeabilidad. Sirven de promotores alcoholes, aminoácidos, el azón (patentado por la compañía Nelson Research en 1976), ácidos grasos y otras sustancias.

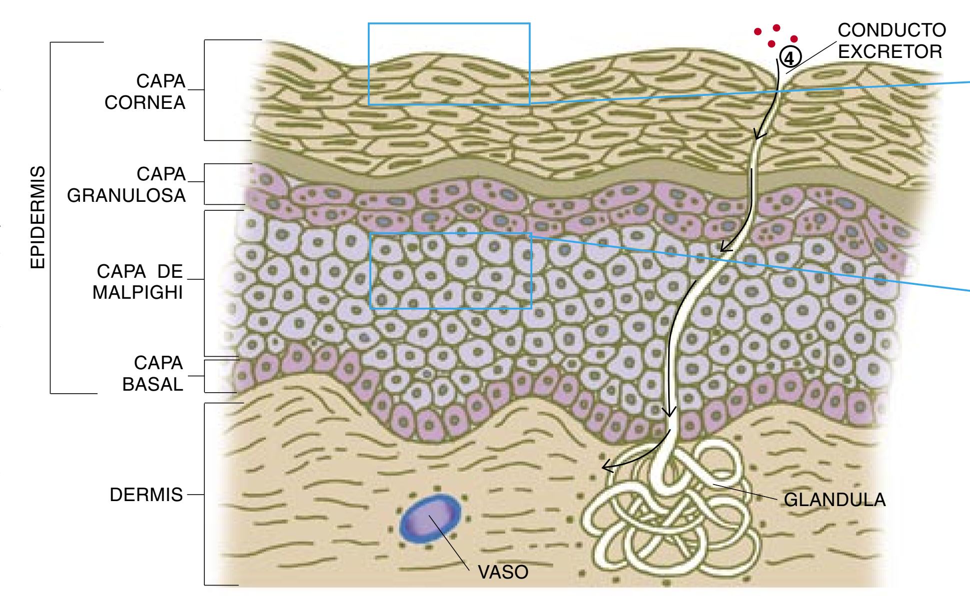
La investigación dirige también la mirada hacia los liposomas; ve en ellos vectores de los fármacos que por sí solos no podrían atravesar la piel. Los liposomas, dotados de una estructura química afín a las membranas biológicas, protegen de la degradación metabólica al principio activo y son biocompatibles y biodegradables.

Los mayores progresos se registran, con todo, en el desarrollo de nuevos métodos físicos que faciliten la penetración del fármaco. Incluyen el uso de campos eléctricos (ionoforesis) y de ultrasonidos (sonoforesis). La ionoforesis se puede utilizar para la administración de moléculas ya sea en forma iónica ya en forma indisociada; en el primer caso el principal mecanismo implicado es la repulsión entre los iones y el electrodo dotados de la misma carga, mientras que en el segundo intervienen fenómenos de electrosmosis y la creación de vías de paso transitorias.

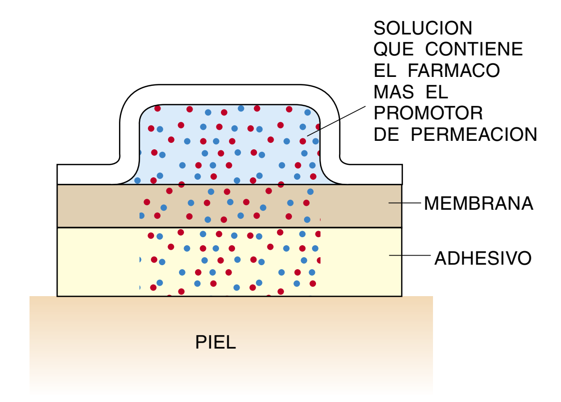
Hay otra razón para ahondar en la sonoforesis: su aplicación en la administración de fármacos peptídicos. Se trata de servirse de ultrasonidos de baja frecuencia para suministrar péptidos de elevado peso molecular. Estudios recientes han evidenciado un incremento de la absorción de péptidos y pequeñas proteínas como la insulina, de magnitud muchas veces superior a la obtenible empleando ultrasonidos de frecuencias terapéuticas (1 megahertz). De acuerdo con las primeras observaciones provisionales, la técnica no comporta efectos indeseables.

También en la administración de fármacos por vía nasal y pulmonar la técnica del proceso reviste importancia capital para la optimización del resultado. Por lo que atañe a la vía nasal, la administración de polvos es óptima, lo mismo en punto a disponibilidad que en lo atinente a la conservación del principio activo.

Ruggero Bettini y sus colaboradores, en el departamento farmacéutico de la Universidad de Parma, han destacado la importancia del aspecto cualitativo de la liberación cuando se suministran polvos por vía nasal, aspecto vinculado a las dimensiones y a la forma de la nube de polvo que suelta el vaporizador. Un dato crucial en la dinámica de la liberación lo representa la dimensión de las partículas; este parámetro puede utilizarse para dirigir la nube de polvo a determinadas regiones de la cavidad nasal o de las vías respiratorias. La disponibilidad del fármaco crece con el empleo de

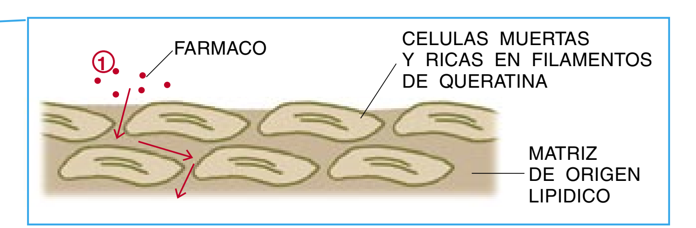


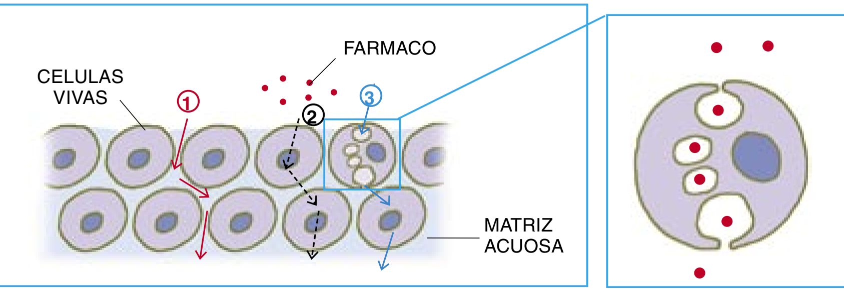
7. LA PIEL ESTA CONSTITUIDA por tres capas principales: la capa córnea, la capa de las células epidérmicas renovables y la dermis. En la capa córnea, el paso de las moléculas se produce a través del retículo de los espacios intercelulares. Esta zona está constituida por una matriz de material lipídico y es, por ello, una barrera difícil de superar para las moléculas hidrófilas. El sustrato subyacente, constituido por células vivas y poco queratinizadas, ofrece varias vías de paso: *1*) a través de los espacios intercelulares, que están bañados de una matriz acuosa fácilmente atravesable por las moléculas hidrófilas y no por las lipófilas;



8. LA ADMINISTRACION transdérmica requiere a menudo promotores de permeabilidad, sustancias que facilitan el paso del principio activo a través de la piel. Para evitar una excesiva absorción del promotor (que a veces permeabiliza con excesiva rapidez) y la consiguiente producción de reacciones adversas, puede emplearse una membrana que sea permeable al principio activo, pero no al promotor. En la figura se muestra una patente Alza para la liberación de estradiol promovido por etanol.

ALBERTO FRIGERIO y FRANCESCA BODEGA trabajan en el "Grupo científico italiano de estudios e investigaciones" que preside el primero. Frigerio cursó la carrera de química en la Universidad de Milán. Ha compaginado la actividad investigadora en laboratorios privados con la docencia universitaria, dentro y fuera de Italia. Bodega se doctoró en ciencias biológicas por la Universidad de Milán, en cuyo instituto de fisiología humana trabaja ahora.





1 VIA PARACELULAR 2 VIA INTRACELULAR 3 ENDOCITOSIS

2) a través de las membranas celulares y, a continuación, a través del citoplasma de las células; *3*) siempre a través de las células, transportadas al interior por vesículas que se forman por invaginación de la membrana celular. Una vez alcanzada la subyacente dermis, rica en vasos sanguíneos, las moléculas penetran en el círculo sistémico. Se ha supuesto que para las macromoléculas hay una cuarta vía de paso, a saber, la desembocadura de las glándulas y de los folículos pilíferos (*4*). En las mucosas, al haber capa córnea, es mucho más rápida la absorción del principio activo.

vectores bioadhesivos (por ejemplo, microesferas) o de promotores de la permeabilidad. La técnica permite, en fin, proyectar vaporizadores que garanticen un más fácil uso y una mayor repetición de la dosis.

Para la optimización de las formas de liberación modificada cobra especial relieve la valoración de su operatividad *in vivo* mediante la determinación de las características cinéticas del principio activo, cuando se le suministra a un voluntario sano, en dosis única, repetida, y, cuando fuere necesario, junto con la comida.

Las perspectivas futuras

Dos son las ciencias que, por su espectacular progreso, habrán de contribuir al refinamiento de los sistemas de liberación modificada: la biología y la ciencia de los polímeros. A esta última debemos la creación de liposomas, micropartículas y nanopartículas.

Los liposomas se cuentan entre los vectores coloidales mejor investigados. En razón de su semejanza con las membranas biológicas, ofrecen una elevada aceptabilidad. Se los puede dirigir hacia dianas concretas, por ejemplo, hacia las células tumorales. Puesto que pueden permanecer largamente en circulación, sirven de refugios y vectores del principio activo, protegiéndolo de una degradación prematura. De ahí el interés puesto en los liposomas para transformarlos en vectores ideales del transporte de péptidos y proteínas. S. N. Tuzel-Kox y sus colaboradores, de la Universidad Humboldt de Berlín, han demostrado la eficacia de los liposomas en el transporte de fármacos y nutrientes a través de la placenta; pero reseñan también el riesgo de daño que corre el feto si a la gestante se la trata con liposomas, precisamente por la eficacia con que estos vectores salen expulsados del círculo materno a través de la placenta.

En la interceptación de las células diana alcanzan una eficacia máxima los inmunoliposomas; éstos se anclan en receptores específicos gracias a la presencia de marcadores de superficie. En el caso de moléculas menos degradables, la molécula marcador puede unirse directamente al principio activo, técnica que reduce los efectos colaterales de algunos agentes citotóxicos utilizados en la terapia contra el cáncer, dirigiendo el fármaco selectivamente hacia las células tumorales.

En otros casos el fármaco puede copolimerizarse con moléculas de diversa naturaleza, formando nanopartículas o micropartículas. Estas estructuras, protegiendo de la degradación el principio activo, aumentan su vida media en el plasma y facilitan su entrada en la célula.

El descubrimiento de la capacidad que algunos biopolímeros esconden de variar las características estructurales en respuesta a la temperatura, el *p*H, la fuerza iónica del medio y otros estímulos externos, ha despertado grandes esperanzas de poder utilizarlos como vectores para la liberación de fármacos "programada".

La síntesis de nuevas moléculas permitirá el desarrollo de sistemas de liberación cada vez más eficaces. Pero a los investigadores les atrae más el empleo de moléculas y estructuras de origen biológico. En el futuro ciertas patologías se tratarán con administración de ADN (por consiguiente, induciendo a nuestras células a producir el principio activo deseado) o de células vivas capaces de liberar, durante un largo período de tiempo, una determinada molécula. Servirán de vectores eficaces nuestros glóbulos rojos, vaciados y cargados con el fármaco.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

IN VITRO AND IN VIVO PERFORMANCE OF AN ORAL DOSAGE FORM DESIGNED FOR TIME AND SITE SPECIFIC DELIVERY IN THE GI TRACT (CHRONOTOPIC SYSTEM). A. Gazzaniga, C. Busetti, E. M. Sangalli, R. Orlandi, S. Silingardi y F. Giordano. 15th. Pharmaceutical Technology Conference, marzo 1996, Oxford.

PASSATO, PRESENTE E FUTURO DELLE FORME A RILASCIO MODIFICATO. P. Colombo, R. Bettini, M. T. Peracchia y P. Santi en *Notiziario Chimico Farmaceutico*, n.º 7, págs. 54-58, septiembre, 1996.

FORME FARMACEUTICHE A RILASCIO MODIFICATO. Rapporto del Gruppo italiano studi e ricerche, Milán, n.º 31, octubre 1996.

MEDICAL APPLICATION OF MICROENCAPSULATING HYBRIDOMA CELLS IN AGAROSE MICROBEADS CYTOMEDICINE-THERAPEUTIC EFFECT ON IGGI PLASMACYTOSIS AND MESANGI-PROLIFERATIVE GLOMERUNEPHRITIS IN THE INTERLEUKIN 6 TRANSGENIC MOUSE. N. Okada, H. Miyamoto, Y. Caneda, Y. Yamamoto, A. Catsume, H. Saito, K. Yorozu, O. Ueda, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, Y. Ohsugi y T. Mayumi, en *Journal of Controlled Release*, n.º 44 (2-3), págs. 195-200, febrero 1997.

Evaluación de la eficacia de los fármacos

A la ahora de valorar un medicamento debemos considerar no sólo la actividad farmacológica, sino también la eficacia clínica y epidemiológica, así como la relación coste-beneficio

Vittorio Bertele y Silvio Garattini

Se considera eficaz un tratamiento cuando prolonga la vida de los pacientes o mejora la calidad de la misma. Debe garantizarse un tratamiento eficaz a todos los que sufren enfermedades graves. Para alcanzar este objetivo, el servicio público de sanidad debe escoger entre los tratamientos disponibles para conseguir un beneficio clínico al menor coste. No hay otra forma de organizar los recursos para garantizar asistencia y tratamiento eficaz a otros pacientes.

Nos proponemos aquí ofrecer un procedimiento metodológico que oriente en el juicio sobre la eficacia de los medicamentos (instrumentos que demuestran y miden un beneficio clínico) y en la elección que ella determine (criterios que establezcan la idoneidad de un tratamiento eficaz extendido a toda la población, en perjuicio de otras posibles medidas con una relación coste-beneficio más alta).





Efecto farmacológico y eficacia clínica

La aspirina es un fármaco de eficacia segura. A sus conocidas propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas se ha añadido en los últimos decenios un efecto antiagregante y, por tanto antitrombótico, cada vez más convincente. La aspirina inhibe la producción de prostaglandinas y tromboxanos, derivados del ácido araquidónico, un ácido graso esencial. Estas substancias ejercen funciones diversas y median distintos fenómenos biológicos, de la agregación plaquetaria a la fiebre. El efecto bioquímico de bloqueo de la producción de tromboxano por parte de las plaquetas no se traduce necesariamente en el efecto biológico observado (inhibición de la agregación plaquetaria). Téngase en cuenta que el tromboxano es el mediador clave de ciertos estímulos fisiológicos que activan las plaquetas. En la formación de un trombo concurren muchos factores diversos (procoagulantes, antifibrinolíticos), además de la activación plaquetaria, lo que supone un factor de dilución del efecto farmacológico adicional *in vivo*. Por tanto, la inhibición parcial de la función de un componente celular de la sangre implicado en los mecanismos de hemostasia y formación de trombos no tiene por qué implicar necesariamente un efecto antitrombótico, ni proteger al individuo ante el posible desarrollo de trombosis coronaria o carotídea. Menos aún cabe esperar la prevención de las consecuencias de estas obstrucciones vasculares, que van desde un episodio isquémico transitorio y reversible (angina, TIA) hasta lesiones graves, permanentes e incapacitantes (infarto miocárdico, ictus cerebral) o incluso la muerte.

1. EN RECONOCIMIENTO a los cuidados que había recibido, nuestro genial aragonés pintó en 1820 el autorretrato *Goya y su médico Arrieta*.

De esta dilución progresiva del efecto resulta que el tratamiento con aspirina de mil individuos adultos y ancianos relativamente sanos provocará en todos ellos una inhibición total de la producción plaquetaria de tromboxano, pero sólo se evitarán diez de los veinte infartos esperados en un plazo de cinco años y no se podrá prevenir ninguna muerte, de origen vascular o de cualquier otra causa.

No son los efectos bioquímicos ni biológicos los que determinan la eficacia de un fármaco, sino la relación entre el beneficio clínico que produce en una población y los riesgos que del tratamiento se derivan.

El beneficio clínico debe ser sustancial. Así como un paciente con



2. ASPIRINA fabricada en Alemania en 1899.

elevado riesgo cardiovascular no se dará por satisfecho con la limitación de la producción de tromboxano plaquetario si ello no se traduce en una importante disminución del riesgo de sufrir un infarto, tampoco se dará por contento con la certeza de esta protección si no se acompaña de una perspectiva de duración y calidad de vida mínimas.

Si la disminución del riesgo de padecer un infarto, observada en una población con prevención primaria como la del ejemplo anterior, no se traduce en un aumento de la esperanza de vida, no se puede hablar de beneficio clínico. El paciente muere de todas formas, tal vez porque la disminución de la función plaquetaria para evitar la trombosis coronaria se corresponde con un aumento de la frecuencia de hemorragias cerebrales. Todo lo que se consigue con esa intervención farmacológica es variar la causa de muerte, de infarto de miocardio a hemorragia cerebral.

Los criterios de definición de eficacia han sufrido modificaciones profundas que tienden a considerar, además de los beneficios relevantes para el paciente, la valoración de su impacto en términos de salud pública (posible transferencia y generalización del beneficio documentado en una muestra de población, costes derivados de extender una intervención en la población en relación con los beneficios que se pueden obtener y en relación con el coste/beneficio de otras intervenciones).

En la actualidad es bastante sencillo establecer la eficacia clínica de un tratamiento agudo. La documentación y la medida del beneficio de un tratamiento crónico, en cambio, todavía presentan algunas dificultades. Resulta difícil efectuar un seguimiento prolongado de los pacientes, mantener invariable el tratamiento y luego traducir las informaciones de un estudio que puede durar uno, tres o cinco años en una propuesta de terapéutica. Aún más pobres son los instrumentos metodológicos de que se dispone para tomar decisiones de política sanitaria justas para el individuo y la colectividad, a partir de consideraciones sobre las necesidades de salud, la oportunidad de intervención o la disponibilidad económica para realizarla.

VITTORIO BERTELE y SILVIO GARATTINI trabajan en el instituto de investigaciones farmacológicas Mario Negri de Milán, fundado en 1963 por el segundo.

Valoración de la eficacia

La eficacia clínica de un fármaco se documenta con estudios clínicos controlados ("randomised clinical trial", RCT) que comparan en una población de pacientes dos estrategias de tratamiento distintas: una experimental, otra de control. La medida de la eficacia y de la seguridad del fármaco experimental respecto a la estrategia terapéutica tradicional viene determinada por la distribución, en los distintos grupos, de los episodios clínicos sobre los que el tratamiento debería incidir.

Los ensayos clínicos están sujetos a distintas reglas metodológicas que se proponen ofrecer el máximo grado de fiabilidad en los resultados del estudio.

La escrupulosa observación de las reglas metodológicas carecería de sentido si el ensayo no respondiera a un requisito fundamental: el planteamiento de un problema real

Niveles de eficacia

efecto farmacológico:	
• **bioquímico**	La actividad propia del fármaco (inhibición enzimática, antagonismo de receptores, antagonismo metabólico) que se puede cuantificar con pruebas bioquímicas (por ejemplo, la disminución de la glucemia en el tratamiento con sulfonilurea)
• **biológico**	y biológicas, como el aumento del tiempo de protrombina de la warfarina
eficacia clínica	Reducción de los episodios de relevancia clínica (infarto de miocardio, recidiva de un tumor mamario, muerte por causa específica o general): la aspirina, por ejemplo, reduce en un 25 % los episodios cardiovasculares en individuos con alto riesgo cardiovascular
eficacia epidemiológica	Eficacia real en la población de pacientes, considerando a quienes no precisan el tratamiento, no se benefician del mismo, lo tienen contraindicado o no lo toleran: es necesario tratar con trombolíticos a cinco o seis pacientes con infarto agudo para evitar una muerte en el primer mes después del infarto
coste/beneficio	Recursos invertidos en el tratamiento en función del beneficio ofrecido, y en relación con tratamientos alternativos: ¿Cuánto cuesta prevenir un episodio coronario o una hemorragia cerebral en un paciente con hipertensión moderada? El coste es de unas 300.000 pesetas al año si se controla la tensión arterial con un diurético, pero asciende a unos 20 millones de pesetas si se emplea un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina

Cánones metodológicos de los

Criterios de inclusión y de exclusión

Son los criterios que definen la población del ensayo y su representatividad respecto a la población general. Los resultados de los estudios son aplicables sólo a pacientes que tengan las mismas características que los de experimentación clínica. Cuanto más seleccionada esté la población del ensayo, menos generalizables serán sus indicaciones a una realidad más compleja. Estas características definen dos tipos de ensayos: uno orientado a establecer el perfil de riesgo/beneficio de un fármaco y otro, más pragmático, llamado de población, que se propone valorar la eficacia del fármaco en un contexto más contaminado con las variables de la vida real. En ambos casos se preferirá una población en la que el factor de riesgo objeto del tratamiento (hipertensión en el caso de un fármaco hipertensivo) esté o aislado o acompañado de otros factores de complicación (insuficiencia cardíaca, diabetes, historia de accidentes vasculares). En el primer caso, el experimento tiende a definir el resultado de un puro efecto antihipertensivo; en el segundo, su eventual eficacia en relación incluso con otras variables que condicionan el pronóstico cardiovascular.

Estocasticidad

Es el procedimiento que, basándose en las leyes de los grandes números, distribuye de manera homogénea variables individuales infinitas en dos grupos de tratamiento para su comparación. Importa que la asignación de un paciente a un grupo sea aleatoria. En primer lugar, resulta imposible distribuir de forma equitativa todas las variables cuya combinación determina los beneficios y riesgos de un tratamiento, por la sencilla razón de que se desconocen en su mayoría. Movido, incluso inconscientemente, por prejuicios a favor o en contra del tratamiento experimental, el clínico podría gravar uno de los dos grupos con variables que considera que empeoran el pronóstico. El sistema más eficaz de aleatorización es el centralizado: una vez se ha decidido incluir a un paciente en el estudio, el clínico recibe la indicación de asignarlo a un grupo determinado desde un centro de coordinación en el que se sigue una lista de números casuales. De esta manera, nadie puede influir en la asignación del grupo del paciente: ni el médico, que desconoce a qué grupo será asignado su paciente, ni el centro de aleatorización, que se limita a registrar sus datos anagráficos.

Tratamiento

El grado de observación de las prescripciones del tratamiento experimental tiene aproximadamente el mismo significado que ya se ha considerado a propósito de la representatividad de la población del ensayo. Una observación más escrupulosa de las recomendaciones relativas a la utilización del fármaco experimental favorecerá un juicio más centrado en el fármaco; una interpretación más flexible de tales indicaciones (que considere, por ejemplo, la posibilidad de olvido saltuario de algunas tomas o de la suspensión del tratamiento durante cierto tiempo, etc.) dará informaciones importantes acerca de la capacidad de transferencia de un eventual beneficio (en la práctica clínica) y su generalización (a la multitud de pacientes). Para demostrar estas características no es necesario un riguroso cumplimiento, difícil de conseguir en todos los candidatos al tratamiento.

En cuanto al grupo de control, la norma de referencia es la administración de placebo, a fin de que lo mismo el paciente (ciego) que el médico y el paciente (doble ciego) desconozcan la naturaleza del tratamiento determinado por la estocasticidad. Se trata de un recurso que evita sesgos relativos a la distinta atención que el médico podría prestar a los dos grupos de tratamiento o a la distinta interpretación de los episodios según se verificasen en uno u otro grupo. La ceguera impide también posibles influencias que el conocimiento de la naturaleza del tratamiento podría tener sobre el paciente. El uso de placebo, no obstante, no es una regla ineludible, sobre todo en el caso de tratamientos de una enfermedad aguda, como el postinfarto inmediato, con resultado fatal (mortalidad general o cardiovascular), valorados por un comité independiente, con características de ciego en lo que respecta al tratamiento. Tampoco es probable el recurso a la ceguera en modalidades terapéuticas con efectos colaterales evidentes (vasodilatadores) o que comporten desventajas injustificables para el paciente (largas terapias de infusión).

Episodios clínicos

Son los criterios de evaluación de la eficacia y de la seguridad del tratamiento experimental. Son preferibles episodios clínicos de tipo alto, de indiscutida relevancia clínica y de fácil determinación: entre ellos, la mortalidad general y, en segundo plano, la

que emerge de la práctica clínica como algo estrictamente ligado a la necesidad y al interés del paciente. A esta característica debe la experimentación clínica su condición como única elección éticamente correcta ante una incertidumbre real sobre los beneficios y riesgos potenciales de un tratamiento nuevo.

La distribución al azar de los pacientes en los dos grupos de tratamiento que se quiere comparar es la mejor respuesta a una situación de incertidumbre objetiva sobre un problema de interés clínico. Cualquier otra posibilidad carece de legitimidad ética. La administración del nuevo tratamiento a todos los pacientes supondría su exposición a los riesgos potenciales ligados a la nueva intervención, a la vez que se les estarían negando los beneficios del tratamiento tradicional. Análogamente, si se negara la nueva modalidad terapéutica a todos los pacientes se les podría privar de un beneficio mayor que el atribuido a la terapia establecida.

La naturaleza del ensayo clínico, cuya función sea la de satisfacer necesidades reales de conocimiento en beneficio del paciente, justifica los procedimientos metodológicos a los que se hacía referencia. La inclusión de cientos o de miles de pacientes en la experimentación y la definición de fines clínicamente relevantes, por citar algunos ejemplos, son decisiones que responden a una exigencia ética, antes incluso que metodológica o científica, de proporcionar a los mismos pacien-

mortalidad derivada de una causa concreta (cardiovascular o, más concretamente, coronaria, tumoral, etc) o episodios singulares no fatales. Los episodios clínicos de tipo bajo son medidas de variables que están más sujetas a errores de valoración subjetiva por parte del enfermo (disminución del dolor) o del médico (cicatrización de una úlcera). Los episodios clínicos de tipo bajo se consideran secundarios en la valoración de la eficacia clínica, aunque a menudo tengan más relevancia que otros episodios clínicos secundarios, como los que miden el efecto farmacológico (reducción de la presión arterial, control de la glucemia, etc.). En ningún caso estos episodios clínicos, también llamados subordinados, pueden sustituir episodios clínicos de tipo alto.

No conviene multiplicar los objetivos de un estudio y sus infinitas combinaciones posibles. Un episodio clínico primario y uno o dos secundarios son más que suficientes para verificar una hipótesis plausible. De otra manera, se corre el riesgo de ofrecer al tratamiento experimental un elevado número de ocasiones de reportar algún beneficio. En tales situaciones es fácil que el beneficio en uno u otro episodios clínicos se deba más al azar que al propio fármaco.

Tamaño de la muestra

Es el parámetro crítico que sirve para evitar dos tipos de error:

— el error a o α o falso positivo, esto es, la atribución al tratamiento experimental de una eficacia de la que en realidad carece; y

— el error b o β o falso negativo, esto es, no reconocer la eficacia que un fármaco en realidad tiene aunque el estudio no lo acredite.

Por convención, se acepta en general que el azar pueda determinar un resultado falso positivo con una probabilidad nunca mayor de 1 o de 5 sobre 1000, eventualidad que nosotros atribuiríamos erróneamente a una relación de causa-efecto (fármaco-beneficio). “P = 0,01” o “P = 0,05” significan precisamente que la probabilidad de que el azar y no el tratamiento sea responsable del efecto se cifre en sólo del 1 % y del 5 %, respectivamente. O sea, la probabilidad de que haya sido el fármaco el que haya determinado un beneficio es respectivamente del 99 y del 95 %. Se habla entonces de un resultado estadísticamente significativo.

Siempre por convención, se acepta que el azar no tenga una probabilidad mayor del 10 o del 20 % de ocultar un beneficio del tratamiento experimental. Se dice que el estudio tiene una potencia del 90 o del 80 %, respectivamente.

Los determinantes de la potencia del estudio y de la posibilidad de ofrecer una respuesta estadísticamente significativa son:

• la frecuencia de los episodios considerados como resultados clínicos del estudio en el grupo de control;

• la reducción relativa de esta frecuencia operada por el fármaco en el grupo experimental.

Cuanto mayores sean estas dos variables, menos numerosa tendrá que ser la muestra. Así, para niveles dados de significación y de potencia, pongamos 0,05 y 80 %, respectivamente, para bajar del 50 al 40 % la mortalidad o discapacidad en seis meses de un ictus, podrían bastar unos 1500 pacientes; sin embargo, para observar un descenso del 20 al 18 % se necesitarían más de 24.000.

Análisis de datos

También para el análisis existe un modelo que favorece la eficacia potencial del fármaco y uno que verifica la consistencia en la práctica clínica, donde es posible, por ejemplo, que un fármaco muy eficaz sea en realidad poco tolerado y, en consecuencia, sea a menudo abandonado por el paciente. El análisis que sigue el crtiterio de

— “eficacia de la droga” excluirá las desviaciones del protocolo del tratamiento experimental, mientras que el análisis que sigue el criterio de

— “intención de tratamiento“ considerará a todos los pacientes según el grupo al que han sido asignados en un reparto aleatorio, con independencia del hecho de que pertenecieran al grupo de tratamiento experimental y lo hayan interrumpido o viceversa, habiendo sido asignados al grupo de control, hayan continuado con el tratamiento experimental.

Incluso subestimando la eficacia potencial del tratamiento experimental, este segundo análisis es preferible, porque refleja mejor las condiciones reales de desarrollo de una estrategia clínica.

tes una solución acertada de sus problemas.

De la misma manera, debe informarse al paciente de la incapacidad momentánea de la medicina para responder a sus necesidades, y el médico ha de solicitar la conformidad para una experimentación que puede resolver las dudas. Estas prácticas forman parte de la relación cooperativa natural entre médico y paciente. Es un tipo de interacción que se repite en la práctica diaria de forma más o menos explícita (“yo te doy un medicamento y tú me dices si se te pasa el dolor de cabeza”), fuera de un contexto controlado, una situación que, con mayor razón, haría necesario un consenso (o tal vez un rechazo) informado.

La proliferación de reglas de procedimiento (las llamadas “Good Clinical Practices”, GCP) crea no pocas preocupaciones. Diseñadas con el propósito de garantizar la calidad de los ensayos promovidos por la industria farmacéutica para valorar el registro de un medicamento, estas normas metodológicas se aplican indiscriminadamente a todos los ensayos clínicos y a todos los fármacos (incluso a los registrados), limitando a menudo las actividades de grupos clínicos independientes y su capacidad de dar pronta y segura respuesta a problemas clínicos reales. Un ensayo poblacional (RCT a gran escala) que encuadra el problema específico de la eficacia de un tratamiento en un contexto epidemiológico complejo, con todas las variables e imprevistos de la verdadera cotidianidad, tendrá

Metanálisis

Aunque el ensayo clínico sea la fuente más fidedigna de demostración clínica y de seguridad de los fármacos, puede suceder que distintos estudios sobre el mismo fármaco (o clase de fármacos) en la misma área patológica tengan resultados no definitivos (beneficio o riesgo marginal) o incluso contradictorios. En tales situaciones quedan por resolver las dudas planteadas. Todo esto es perfectamente posible desde el momento en que la planificación de la dimensión del estudio contempla por convención la posibilidad de que un resultado dado (positivo o negativo) pueda ser fruto del azar y no consecuencia del tratamiento. Para resolver estas dudas se ha diseñado un instrumento metodológico llamado metanálisis. Mediante suma algebraica de los beneficios y perjuicios registrados en el ensayo, el metanálisis proporciona una estimación más fiable y más veraz del beneficio o del riesgo atribuible a una intervención.

Los grandes metanálisis realizados en la última década han contribuido a resolver, entre otras cuestiones de interés, la eficacia de fármacos anticoagulantes en las patologías cardiovasculares, la eficacia relativa de diferentes trombolíticos en el infarto agudo o la eficacia de la heparina en la prevención de embolias venosas.

El metanálisis sirve de ayuda para orientar la práctica clínica a la espera de pruebas más directas, que sólo vendrán, una vez más, de estudios clínicos controlados. En estos nuevos estudios, el metanálisis ofrece indicaciones útiles; de esta manera, puede reorientar la hipótesis originalmente relativa a la eficacia generalizada de un tratamiento hacia un subgrupo específico de pacientes, que obtienen mayor beneficio.

Un uso más difundido, aunque menos legítimo, es el metanálisis de ensayos clínicos a los que se aplican los sesgos metodológicos más frecuentes de falsa positividad: definición de resultados clínicos irrelevantes, estocasticidad deficiente, falta de autenticidad de la hipótesis y, sobre todo, escasa potencia. En estas condiciones, el metanálisis excluye los estudios que no se han publicado por haber arrojado un resultado negativo, incrementa la positividad sin fundamento clínico y acumula, más que episodios clínicos, sucesos aleatorios. El recurso al metanálisis no sólo resulta inútil en estos casos, sino también perjudicial, pues multiplica las falsedades a la par que las legitima.

por fuerza que renunciar a la asepsia formal de un estudio centrado exclusivamente en el problema del nuevo fármaco. Este último se beneficiará de una selección extrema de los pacientes, de una evaluación diagnóstica atenta, de un riguroso cumplimiento del tratamiento, de una valoración exacta de episodios clínicos con un nivel de exigencia bajo o, mejor aún, de otros eventos que los sustituyan (los niveles de tensión arterial mejor que el ictus o la muerte).

Tenderán, en fin, a situar la prueba de la eficacia de un tratamiento en un ámbito rigurosamente controlado en el que los condicionamientos extraños al objeto de experimentación se minimicen. Así, el tratamiento será la única variable capaz de modificar la situación. En un ensayo poblacional, en cambio, el candidato al ensayo puede o no ser diabético, el diagnóstico puede ser de presunción o estar equivocado, el tratamiento se puede interrumpir o suspender.

En el primer ensayo será indispensable un control de calidad de las pruebas de bioquímica clínica o una estandarización preliminar de los procedimientos para la medición de la presión arterial. En un ensayo poblacional sería más útil prescindir de algunas reglas formales, por ejemplo, la de la confidencialidad de los datos anagráficos de los pacientes incluidos en el estudio. Inútiles en un ensayo que valorase la acción de un fármaco sobre los niveles de colesterol o de presión arterial, esos datos, en cambio, serían valiosos en un estudio que tuviera por objetivo controlar a través de los anagráficos la supervivencia de los pacientes en un largo período y ofrecer una información más completa sobre el pronóstico de la enfermedad y los efectos del tratamiento experimental.

Interpretación de la eficacia

Los resultados de un estudio clínico controlado tienen varias claves de lectura. La reducción del riesgo relativo (RRR) es a menudo sugestiva; mas, precisamente por esto, induce a confusión. Cuando el riesgo de pacientes expuestos a un tratamiento respecto a los pacientes no expuestos es del 0,5, se dice que el tratamiento ha reducido a la mitad el riesgo de los pacientes, o sea que se tiene una RRR del 50 por ciento.

Pero el riesgo relativo no es una medida absoluta del beneficio atribuible a un tratamiento: es sencillamente una proporción que representa la relación entre la incidencia de episodios en los dos grupos de tratamiento. Lo que mejor representa el beneficio alcanzado con el tratamiento experimental es la reducción del riesgo absoluto (RRA). De hecho, para una misma disminución proporcional del riesgo respecto al grupo de control, la reducción absoluta del riesgo variará sensiblemente en relación con la incidencia de los episodios.

Marcos de referencia y eficacia

De este tipo de valoraciones se deduce que se ha de tratar a una gran proporción de la población para beneficio de unos pocos. Incluso en situaciones en las que el tratamiento resulta sumamente útil (véase la terapia antitrombótica en el infarto agudo) es sorprendente la escasa eficacia de la intervención. En el ejemplo anterior, se observaba que, para reducir a la mitad el riesgo de muerte en el infarto agudo (del 10 al 5 por ciento), se tratan inútilmente 95 pacientes de cada cien: 90 no morirían aunque no recibieran tratamiento y cinco morirían de todas formas, aun tratados.

Este es un dato impresionante, consecuencia por otra parte del hecho de que en Occidente la salud y la supervivencia han alcanzado niveles que son cada vez más difíciles de mejorar, donde las enfermedades que los condicionan tienen etiología multifactorial (la mitad son enfermedades cardiovasculares y patología tumoral otra tercera parte). Otras patologías, como las infecciosas, están bajo control gracias a la vacunación y a los antibióticos específicos para cada microorganismo patógeno; la prevención de un infarto de miocardio y de sus consecuencias hace necesario el seguimiento de una serie de factores condicionantes, cada uno de los cuales contribuye a constituir un cuadro de riesgo complejo. El control de los

Medidas de eficacia

Entre los parámetros de medida a que remite la ponderación de la eficacia de un fármaco, señalaremos el riesgo relativo (RR), la reducción del riesgo relativo (RRR), la reducción del riesgo absoluto (RRA), los intervalos de confianza (IC) y el número de pacientes que se deben tratar para evitar la aparición de un episodio (NNT).

RR = (riesgo de los tratados)/(riesgo de los controles)
o
= (incidencia de episodios en los tratados)/(incidencia de episodios en los controles)
En el caso de un tratamiento antitrombótico que reduzca del 10 % al 5 % la mortalidad en la fase aguda del infarto, se tendrá
= (5/100)/(10/100) = 0,05/0,10 = 0,5
o sea, que el riesgo de los pacientes tratados es del 50 %, la mitad del riesgo del grupo de control. La reducción del riesgo, en este caso concreto, también será del 50 %.

En efecto:
RRR = (incidencia de episodios en los controles – incidencia de episodios en los tratados)/(incidencia de episodios entre los controles)
= (0,10 – 0,05)/0,10 = 0,05/0,10 = 0,5
RRA = (incidencia de episodios en los controles – incidencia de episodios en los tratados)

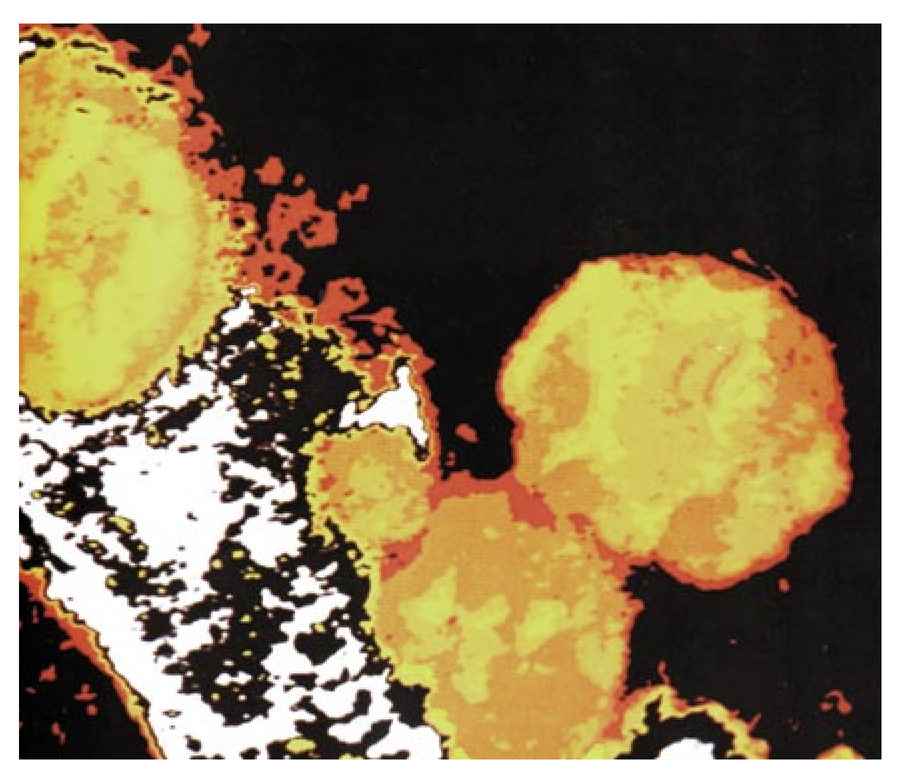
En el caso del tratamiento hipotético del ejemplo precedente, que reducía la mortalidad en la fase aguda del infarto del 10 % al 5 %, se tendrá
= (10/100) – (5/100) = 0,10 – 0,05 = 0,05 o sea 5/100 o 5 %
esto significa que, de cada cien pacientes tratados, tendremos cinco episodios menos que con relación a los registrados entre 100 pacientes del grupo de control.
Un tratamiento antitrombótico puede tener la misma eficacia proporcional, esto es, reducir en un 50 % el riesgo relativo de los pacientes de prevención primaria, aquellos que no han tenido nunca un accidente cardiovascular y que, como tales, presentan un riesgo absoluto (incidencia de episodios) menor que quienes ya han sufrido un infarto. Supongamos que en estos pacientes el riesgo de padecer un episodio cardiovascular sea del 2 % y que el tratamiento reduzca a la mitad ese riesgo, al 1 %. La RRR seguirá siendo del 50 %, pero la RRA será
= (2/100) – (1/100) = 0,02 – 0,01 = 0,01 o 1/100 o 1 %
de cada cien pacientes tratados tendremos un episodio menos que los dos registrados entre los cien pacientes del grupo de control. El beneficio se reduce a evitar la aparición de un caso en cada cien personas tratadas.
Las estimaciones de riesgo, relativo o absoluto, guardan correlación con los intervalos (o límites) de confianza (del 99 % o, con mayor frecuencia, del 95 %). Los intervalos de confianza (IC) definen el ámbito en cuyo interior el valor de la reducción del riesgo puede encontrarse en un 99 o 95 % de los casos, si el ensayo se repitiera más veces (el residuo 1 o 5 % supone la concesión convencional de que el azar y no el fármaco sea responsable de los resultados). Supongamos que la RRA de 0,01 del ejemplo anterior se haya dado en un estudio realizado con 25.000 individuos, 12.480 en el grupo tratado y 12.520 en el grupo de control. Estimemos los intervalos de confianza según la fórmula

IC95 % $= \pm 1,96 \sqrt{[Pc\ (1 - Pc)/Nc + Pt\ (1 - Pt)/Nt]}$

donde Pc y Pt son las incidencias de los episodios en los controles y en los tratados, respectivamente, y Nc y Nt el número de pacientes (sujetos a distribución aleatoria) del grupo de control y del grupo de tratamiento experimental, respectivamente. En el caso de una distribución normal, es fácil prever la distribución de los valores bajo la campana de Gauss: se sabe así que poco menos de dos errores estándar (precisamente el 1,96 de nuestra fórmula) definen el área de la campana que contiene el 95 % de las probabilidades. Poco más de 2,5 ES (desviación típica), 2,576 para ser más exactos, definen el área que contiene el 99 % de las probabilidades. Según el ejemplo,
$= \pm 1,96 \sqrt{[0,02\ (1 - 0,02)/12.520 + 0,01\ (1 - 0,01)/12.480]}$
= ± 0,0025 o ± 0,25 %
esto es, si se repitiera cien veces el test de la hipótesis, en al menos 95 de estos ensayos clínicos se observaría un valor para RRA del 1 % ± 0,25, un beneficio comprendido entre uno mayor (RRA = 1,25 %) y uno menor (RRA = 0,75 %) respecto al observado en el ensayo, aunque siempre mayor que cero.
El número de pacientes que se deben tratar para evitar un episodio (NNT) es el recíproco de RRA,

NNT =1/RRA

En los ejemplos anteriores, se tendrá
=1/0,05 = 20 pacientes con infarto agudo
=1/0,01 = 100 pacientes de prevención primaria
Bastará con tratar a veinte pacientes en la fase aguda del infarto para evitar un episodio, pero se tendrá que tratar a cien para evitar un solo primer accidente vascular.



3. MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA de la aorta de un ratón al que se le administró durante sesenta días una dieta rica en colesterol. Se observa claramente la incorporación de gotas lipídicas (*amarillas*) en las células endoteliales. (Fotografía de E. Giovenzana, que publicamos por cortesía de Edizioni SKEMA.)

	ISIS-2	PHS
AREA	INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO	PREVENCION PRIMARIA
N.º DE PACIENTES	17.000	22.000
EPISODIO CONSIDERADO	MUERTE	INFARTO DE MIOCARDIO
TIEMPO	5 SEMANAS	5 AÑOS
INCIDENCIA DEL EPISODIO		
• CONTROL	13,2%	2,1%
• CON TRATAMIENTO	8,0%	1,2%
RRR	40%	44%
RRA	5%	1%
NNT	20	100

Estos dos estudios son también un buen ejemplo por las características que los dividen en punto a transferencia del dato experimental a la realidad clínica. La admisión de pacientes en ISIS-2 se facilitaba sobremanera; para incluir al paciente en la distribución estocástica, bastaba la mera sospecha de infarto reciente, sin exigirse la confirmación diagnóstica. Puesto que, ante una trombosis coronaria, el tratamiento antitrombótico es tanto más eficaz cuanto más precoz, esta decisión ha implicado que los pacientes reclutados para el ensayo clínico supongan una fracción importante de la población candidata al ensayo. Y viceversa, en PHS, sucesivas fases de selección de los candidatos ha reducido la representatividad de los participantes en el ensayo respecto a la población general, que, por definición, es potencial objeto de una intervención de prevención primaria. Los sujetos incluidos en la distribución estocástica en el estudio PHS no llegaban al 10% de los candidatos al ensayo; por eso, el beneficio observado, exiguo de suyo, se diluye aún más. En una pequeña fracción de la población a la que se propusiera de forma general la prevención con aspirina, muchos declinarían, otros no estarían en condiciones de seguir el tratamiento, otros no lo tolerarían más allá de unas semanas, etc.

niveles de la presión arterial o del colesterol en sangre, la inhibición de la función plaquetaria o de la formación de trombina representan intentos insuficientes de reducción del riesgo aterotrombótico.

En tales situaciones resultan más apropiadas medidas de la eficacia que tengan en cuenta las ventajas individuales, pero en un mayor ámbito epidemiológico de población. Una de tales medidas es el número de pacientes que se deben tratar (NNT) para evitar un episodio.

Estas consideraciones encuentran confirmación práctica en la realidad de los hechos, ejemplificada en la comparación entre los resultados de dos grandes ensayos clínicos de prevención cardiovascular. El segundo estudio internacional de supervivencia al infarto, ISIS-2, investigó pacientes de alto riesgo que acaban de sufrir un infarto y que tienen una probabilidad del 13 por ciento de morir en breve. El objetivo del estudio era documentar un eventual beneficio del tratamiento antitrombótico, anticoagulante y trombolítico con aspirina y estreptocinasa.

El otro ensayo incluía sujetos sanos adultos y ancianos, todos ellos médicos norteamericanos, de los que el estudio tomó el nombre (proyecto PHS). En esta población se quería verificar si un tratamiento de prevención con aspirina reducía el número de episodios vasculares con el paso del tiempo. Además de ejemplificar la tesis según la cual una misma reducción del RR (40 por ciento en ambos estudios) con tratamiento antitrombótico se corresponde con un impacto variable en términos de eficiencia en las dos condiciones de riesgo distintas, la comparación de ISIS-2 y PHS permite apreciar diferencias substanciales, también en términos de calidad de beneficio clínico observado y tiempo que se necesita para obtenerlo.

Con el tratamiento experimental de ISIS-2, es suficiente con tratar veinte pacientes durante cinco semanas para evitar una muerte; con PHS se necesitan cinco años de tratamiento de cien pacientes para evitar un infarto, no necesariamente fatal (en términos de mortalidad no se puede hablar de beneficio alguno).

La consideración de la parcialidad del resultado clínico en relación al esfuerzo terapéutico —y a sus costes— hace necesarios otros indicadores del beneficio potencial de un tratamiento, además del NNT. Contrariamente a esto, por ejemplo,

EN 1000 PACIENTES CON	TRATADOS CON	SE EVITAN	EN UN PLAZO DE	Nº DE PACIENTES QUE SE DEBEN TRATAR PARA EVITAR UN EPISODIO	FUENTE
Antecedente de infarto o angina + Colesterolemia media[1] 260 mg/dl	sinvastatina	90 infartos o muertes coronarias 33 muertes (por cualquier causa)	5-6 años	11 durante 5-6 años (30 durante 5-6 años)	4S Study (*Lancet* 1994; 344:1383)
Varón sin antecedentes cardiovasculares + colesterolemia media[2] 270 mg/dl	pravastatina	24 infartos o muertes coronarias 9 muertes (por cualquier causa)	5 años	40 durante 5 años (110 durante 5 años)	WOSCOP (*New England Journal Med.* 1995; 333:1301)
Antecedente de infarto + colesterolemia media[3] 210 mg/dl	pravastatina	30 infartos o muertes coronarias 8 muertes (por cualquier causa)	5 años	33 durante 5 años (110 durante 5 años)	CARE (*New England Journal Med.* 1996; 335:1001)

Criterios de inclusión:
[1]colesterolemia 215-310 mg/dl [5,5-8 nmol/L] [2]colesterolemia ≥ 250 mg/dl [≥ 6,5 nmol/L] [3]colesterolemia ≤ 240 mg/dl [≤ 6,2 nmol/L]

la estimación de los años de vida ganados permite valorar de manera distinta el "peso" de un episodio prevenido en un adulto de edad mediana y en un anciano. Este criterio de valoración es todavía poco sensible en una sociedad longeva y relativamente sana como la nuestra. Piénsese que, si se eliminara el cáncer de la faz de la tierra, la esperanza de vida aumentaría en un solo año. Con las intervenciones actualmente disponibles, la esperanza de vida apenas puede verse incrementada en algunas semanas.

Si no se pueden añadir años a la supervivencia media, que en los países occidentales se ha incrementado en veinte años en el último siglo, el objetivo se traslada a mejorar la calidad de vida de los años ya ganados (QALY). Es éste un parámetro cada vez más socorrido en la valoración de la eficacia de las intervenciones y su oportunidad económica, sobre todo como variable asociada a la supervivencia.

Restricciones epidemiológicas al ejercicio de la eficacia

El coste se ha transformado en un parámetro indisociable de la valoración de la eficacia de los fármacos. Los recursos limitados de la sanidad pública obligan a tomar decisiones que a veces parecen alejarse del objetivo de garantizar a todos el máximo de salud posible. Cualquier decisión en materia de intervención sanitaria que no tenga en cuenta los costes puede suponer un empleo ineficaz de los recursos disponibles. De esta manera se puede favorecer a algún individuo (o a un grupo) en situación de riesgo en perjuicio de muchos más. La economía de las intervenciones sanitarias, y en consecuencia también el uso de fármacos, sirve a un criterio de equidad.

El coste de un fármaco no basta, por sí solo, para avalar la compatibilidad económica de un tratamiento. Un tratamiento, aunque barato, aplicable en potencia a millones de personas puede suponer una carga onerosísima para la sanidad pública (pongamos por caso la aspirina en la prevención primaria de episodios cardiovasculares en sujetos con factores de riesgo). En la situación opuesta, un tratamiento muy caro pero limitado a una categoría muy seleccionada de pacientes (por ejemplo, un trasplante de órgano) podría ser compatible con los recursos disponibles.

A la hora de determinar una rigurosa jerarquía de prioridades en la elección de una intervención, parece más adecuada la relación coste/eficacia. Pero la eficacia no debe entenderse referida a las necesidades de un individuo o grupo, sino que ha de mirarse en función del modo en que otras intervenciones satisfagan las necesidades de los demás en una jerarquía de prioridades y de compatibilidades.

Para superar el conflicto entre las necesidades individuales y el interés colectivo, la farmacología y la epidemiología clínicas buscan nuevos instrumentos de valoración de la eficacia de los fármacos. Aparecen situaciones similares a las desarrolladas en los últimos años en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Fármacos potentes como las estatinas resultan no sólo farmacológicamente activos, sino también útiles para condicionar el pronóstico vascular, y no sólo vascular, de pacientes con distintos

Hagamos cuentas

El estudio WOSCOP ha demostrado un beneficio sustancial en el tratamiento con estatinas (RRR de episodios coronarios en 5 años 31 %, RRA 2,4 %) en alrededor de 6600 individuos sin antecedentes cardiovasculares y con hipercolesterolemia (≥ 250 miligramos/decilitro), seleccionados de una población de 160.000 adultos, varones (de edades comprendidas entre los 45 y los 64 años).

Si la razón de sujetos tratados a sujetos/candidatos fuese la del ensayo clínico (4 %), se calcula que más de 270.000 personas podrían recibir el tratamiento en el Reino Unido. En realidad, se podría pensar que el resultado del ensayo recomienda un tratamiento con estatinas a todos los varones de 45-64 años de edad con una colesterolemia ≥ 250 miligramos/decilitro (esto es, el 36-40 % de la población de la Gran Bretaña en esa franja de edad). De esta forma, unos 2,5 millones de ingleses podrían recibir tratamiento. ¿El coste? 800 libras esterlinas por cabeza y año multiplicado por unos 2,5 millones de individuos...

El problema de la equivalencia

La relación coste/beneficio permite a los servicios de sanidad pública escoger el tratamiento más económico entre opciones alternativas con la misma eficacia e idéntica seguridad. Importa establecer si un tratamiento es tan eficaz como otro que se considera la mejor terapia posible para una patología dada, según los resultados de los ensayos clínicos controlados. Pero documentar la equivalencia entre dos fármacos no es una tarea sencilla. La metodología de los ensayos clínicos no se puede trasladar sin más al problema de la equivalencia: el ensayo es útil para definir las diferencias entre tratamientos; pero si dos tratamientos no resultan diferentes entre ellos en términos de eficacia clínica, no significa que deban considerarse necesariamente equivalentes. Algunas líneas maestras intentan prevenir errores metodológicos que impliquen una lectura acrítica de los resultados de un ensayo en términos de "equivalencia" en lugar de "no diferencia". No obstante esta cautela, las interpretaciones de los resultados de un ensayo clínico provocan a menudo perplejidad.

Un ejemplo

El ensayo clínico INJECT compara dos estrategias trombolíticas en el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Se cree que un nuevo activador tisular del plasminógeno (tPA) está en condiciones de reducir en un 1 % la mortalidad registrada en pacientes que se tratan con estreptocinasa (SK) después de un infarto. Pero, dada la dificultad de demostrar este beneficio teórico, se pretende demostrar que el tratamiento experimental es, al menos, equivalente al tradicional.

La mortalidad en el primer mes después del infarto se aproxima al 9,5 % en el grupo SK y al 9,0 en el grupo tPA. Se observa, pues, una reducción del 0,5 %, que los intervalos de confianza consideran comprendida entre una posible reducción del 1,98 % y un aumento del 0,96 %. El peor resultado considerado, inferior al 1 % de aumento de la mortalidad, se adopta como criterio de equivalencia en el protocolo del ensayo clínico. Este resultado se aleja aún más del límite predefinido del 1 % de exceso de mortalidad, si se consideran sólo los pacientes que en efecto han recibido el tratamiento y se aplica un test estadístico menos conservador: el exceso máximo de mortalidad en el grupo tPA respecto al grupo SK es sólo del 0,7 %. La conclusión señala la equivalencia de los dos tratamientos.

Queda por mencionar el hecho de que un riesgo potencial adicional del 1 % (o del 0,7 %, si se prefiere) es desproporcionado y difícilmente aceptable si se aplica a un evento que tiene una incidencia del 9 % y a una patología con elevada prevalencia en la población general. A modo de ejemplo, supondría considerar equivalente al tratamiento tradicional uno que aplicado a los 500.000 pacientes afectados al año en Italia podría salvar 10.000 vidas, pero también sacrificar 5000 más. La perplejidad aumenta cuando se considera la seguridad de cada tratamiento: más de 6000 pacientes del grupo tPA podrían sufrir un ictus cerebral en el postinfarto inmediato, por sólo 5000 del grupo SK.

En conclusión: aunque pueda parecer sorprendente, un juicio de equivalencia requiere una cautela aún mayor que uno de eficacia. La documentación científica de la equivalencia de dos tratamientos precisa afinar la metodología de los ensayos clínicos, con la que ya se han obtenido resultados tan relevantes en punto a definición de la eficacia de los fármacos.

niveles de riesgo con colesterolemia elevada.

Se han llevado a cabo diferentes trabajos experimentales en esta área de riesgo para valorar la eficacia clínica. De acuerdo con los resultados, se ha observado que, aunque se consiga el mismo grado de protección relativa en las diversas categorías de riesgo, el tratamiento no es generalizable a todas.

El tratamiento debe limitarse, por tanto, a quienes, en términos relativos y absolutos, tengan un mayor riesgo, que no serán forzosamente quienes presenten un nivel de colesterol más elevado. Lo que mejor predice el riesgo de un evento cardiovascular no es un factor aislado (hipertensión arterial, hipercolesterolemia, tabaco, etc.), sino la consideración global y compleja de los factores de riesgo del individuo. Los grandes estudios epidemiológicos, realizados sobre todo en el Reino Unido, proporcionan datos para diseñar escalas de riesgo, basadas en la incidencia de episodios observados en subgrupos de población portadores de distintas combinaciones de los factores de riesgo.

A veces los mismos ensayos clínicos proporcionan el escenario epidemiológico para determinar las áreas de aplicación más eficiente del beneficio del tratamiento. Es el caso de WOSCOP, cuyos resultados evidencian una vez más que, a pesar de presentar la misma reducción proporcional de los episodios coronarios en las diversas categorías de riesgo, el beneficio absoluto varía sensiblemente en relación con el riesgo absoluto de cada una de estas categorías.

Por ejemplo, la probabilidad de sufrir un accidente coronario en un plazo de cinco años es del 3,5 por ciento para un varón de 50 años con hipercolesterolemia, pero superior al 12 por ciento para un hombre diez años mayor que sea, además, hipertenso. Reducir en un tercio el riesgo en ambos perfiles tratando el factor colesterol supone evitar poco más de un evento cada cien pacientes tratados en el primer caso y más de cuatro eventos cada cien pacientes tratados en el segundo.

Pero, ¿cuál es el nivel de riesgo que merece la pena tratar? Algún organismo europeo ha sugerido como umbral crítico de riesgo cardiovascular el nivel que se relacione con una incidencia de accidentes coronarios del 20-40 por ciento en diez años. Tomando en consideración estas recomendaciones y asumiendo que los episodios siguen una distribución lineal en el tiempo, el grupo de estudio WOSCOP propone que las categorías con riesgo coronario igual o superior al 10 por ciento en el plazo de cinco años sean candidatas al tratamiento con estatinas.

La determinación del nivel de riesgo a partir del cual se debe iniciar el tratamiento no se basa únicamente en el NNT o los QALY. También influye la proporción de la población que se debería tratar siguiendo ese criterio y la relación coste/eficacia esperada.

Los creadores de la tabla de Sheffield, una famosa escala de riesgo,

proponen este tipo de valoración para un nivel de riesgo dado de 1,5 por ciento al año, un nivel de riesgo inferior al de la propuesta por organismos europeos. De lo que se trata es de ver si se puede incrementar el número de los potenciales beneficiarios de un tratamiento protector con estatinas.

Pero no podemos caer en una medicalización en masa, en la que un adulto o anciano de cada cinco tenga que iniciar el tratamiento. Se considera impracticable una intervención tan costosa, por lo que el grupo de Sheffield propone un umbral más restrictivo a partir del cual se indique el tratamiento: el nivel crítico de riesgo se sitúa en una probabilidad de eventos coronarios del 3 por ciento al año, esto es, 15 por ciento en cinco años y 30 por ciento en diez años, en sintonía con recomendaciones europeas.

Según este nuevo modelo, un varón de cincuenta años sin antecedentes vasculares no precisaría tratamiento con estatinas aunque tuviera una colesterolemia de 300 miligramos/decilitro, a menos que fuera fumador e hipertenso. Con estos mismos factores de riesgo, una mujer de la misma edad no debería recibir tratamiento a menos que, además del tabaco y de la hipertensión, presentase hipertrofia cardíaca.

¿Qué haremos entonces con nuestro paciente cincuentenario con elevados niveles de colesterol pero sin otros factores de riesgo? En su caso, el riesgo de sufrir un accidente coronario es, por ejemplo, del 2 por ciento anual, no tan alto como para requerir tratamiento, según el modelo de Sheffield. Pero, por otra parte, el tratamiento reduciría el riesgo en una tercera parte.

Decisiones parecidas en el campo de la política sanitaria a menudo desatan polémicas y plantean objeciones éticas. Esto depende sobre todo de la pobreza de conocimientos sobre la adecuación de los parámetros de coste y eficacia y de la ausencia de reglas para su empleo apropiado. ¿Qué es lo que marca la diferencia? ¿El coste de un episodio que se ha evitado? Y si es así, ¿qué evento? ¿El coste de un año añadido a la esperanza de vida? Y si es así, ¿qué vida: sin cáncer? ¿Sin Alzheimer?



4. CORRELACION entre la incidencia anual de ictus cerebral y presión arterial sistólica en sujetos con edades comprendidas entre los 45 y los 74 años en un seguimiento de 18 años de duración.

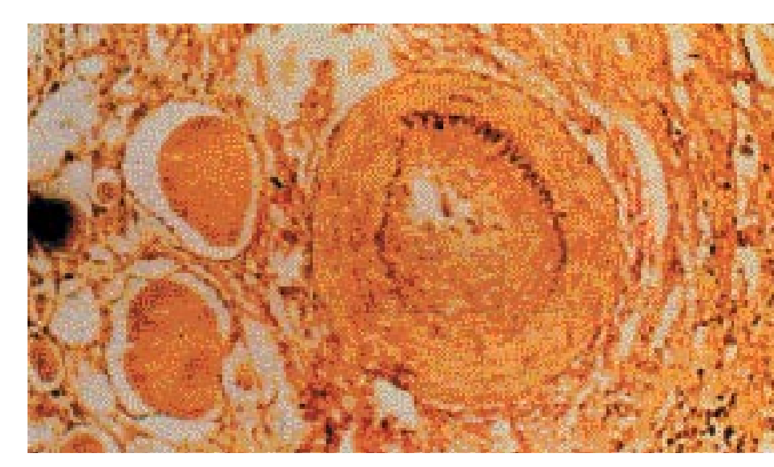
Aspecto ético de la elección de las intervenciones oportunas

El vínculo impuesto por la limitación de los recursos disponibles es sólo el marco de un cuadro cuyo interior aún no está definido de manera suficiente: además de la estandarización de los criterios de eficacia terapéutica de un fármaco, aquí hemos considerado sobre todo la incertidumbre que se refiere a la valoración de su impacto epidemiológico (NNT, años de vida ganados, QALY) y su aplicabilidad (a quién tratar, durante cuánto tiempo, en lugar de a quién, a qué precio, etc.).

Es un cuadro en el que aún faltan métodos e información. Se requieren sistemas fiables que consideren la calidad de vida como parámetro de efectividad, por ejemplo; se precisan datos que permitan escoger un tratamiento igual de eficaz, pero menos caro que otro, y necesitamos información detallada sobre la estratificación del riesgo en las distintas patologías, conocimientos por lo demás exigidos para armonizar las medidas de política sanitaria. (¿Qué situación de riesgo es preferible tratar en lugar de la de un paciente con colesterolemia, tomando como referencia los datos de coste/beneficio de los tratamientos respectivos?)

Es un cuadro que genera perplejidad de diversa índole: ¿es siempre justificable el sacrificio de las necesidades del individuo en nombre del bien común? ¿Qué lugar deja esta perspectiva de la eficiencia a los enfermos terminales de cáncer, a los enfermos de Alzheimer, etc., cuyos tratamiento y asistencia sólo generan gastos pero ninguna efectividad? ¿Convendrá tratar las enfermedades raras, a la luz de los costes previsiblemente elevados de un mercado limitado por definición? ¿Qué papel debe asumir el médico en su labor de mediador y de árbitro entre los intereses, a menudo divergentes, si bien ambos sagrados, de su paciente y de la colectividad? ¿Alcanzará también en el tema del coste/beneficio el grado de distanciamiento emocional de su quehacer cotidiano que empieza hoy a hacerle abandonar un fármaco que, "en su experiencia", ha dado "impresión" de eficacia para escoger un tratamiento cuya eficacia se ha documentado en ensayos clínicos que no siempre reflejan lo que el galeno encuentra cada día en su práctica clínica?

Existe, además, por parte del paciente un problema de elección (o de posibilidad de elección) en sentido opuesto. Si un riesgo, por pequeño que sea, se puede reducir, ¿por qué no habría de sufragar el coste quien, en sustitución del servicio público de sanidad, pudiera hacerse cargo en primera persona del desembolso? Habituados a asegurar todo lo posible, hasta la vida, ¿no deberíamos



5. HIPERTROFIA de la pared de las arterias en un paciente con hipertensión de larga evolución.

Un modelo: las estatinas

efecto farmacológico:	
• **bioquímico**	mediante la inhibición del hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA), las estatinas reducen la síntesis de colesterol y la producción hepática de LDL; sus niveles sanguíneos disminuyen un 20-25 %
• **biológico**	Reducen las placas arterioescleróticas
eficacia clínica	Reducen en un tercio los eventos coronarios • de 8,5 a 5,0% en prevención secundaria • de 7,9 a 5,5% en prevención primaria Reducen en un tercio la mortalidad general • de 11,5 a 8,2% en prevención secundaria • de 4,1 a 3,2% en prevención primaria
eficacia epidemiológica	Incrementan en unos cuatro meses la esperanza de vida (74,5 años) de un varón de 59 años con niveles medios altos de colesterol (260 mg/dl); se deben administrar a 30 pacientes durante cinco años para evitar: • 1 episodio coronario • 1 muerte en prevención secundaria se deben administrar a 110 pacientes durante cinco años para evitar: • 1 muerte en prevención primaria
coste/rendimiento	En un varón de 59 años con niveles medios-altos de colesterol un año de vida ganado cuesta unas 800.000 pesetas

El perfil de las relaciones beneficio/riesgo y coste/beneficio nunca queda lo bastante claro. Aunque rico en valoraciones y en informaciones, el ejemplo de las estatinas que aquí se ha tomado como modelo presenta aún aspectos que no están bien definidos. Así, la curva de supervivencia de los pacientes tratados con estatinas en los ensayos clínicos tiende a divergir progresivamente de la del grupo de control, lo que permite suponer que un tratamiento que se prolongue de forma indefinida puede garantizar una eficacia superior a la observada en el período de experimentación. Todavía no se conocen los riesgos a que el tratamiento expone en un período largo. Sólo sabemos que son mayores cuanto más extendido se halla el empleo del fármaco. De confirmarse en el hombre la sospecha de su posible carcinogenicidad, que ha aparecido en los modelos experimentales animales, ¿cuál sería la relación riesgo/beneficio de un tratamiento a largo plazo? Admitiendo que entonces aún sea oportuno valorarlo, ¿cuál sería la relación coste/beneficio?

asegurarnos una posible supervivencia invirtiendo en estatinas en lugar de en pólizas de seguros? Esto terminará por crear un ulterior elemento de disparidad entre capas sociales, anulando de hecho los criterios de equidad en los que se inspiran las elecciones eficientes de política sanitaria. Es un elemento de discriminación que se añade a otros que condicionan un bien primario y universal de la salud: desde la calidad de vida, al grado de instrucción y, poco a poco, las miles variables que determinan en diversa medida la riqueza y la pobreza.

Las consideraciones relativas a las desiguales oportunidades de acceso a los servicios sanitarios pueden generalizarse del estrecho ámbito de un conflicto de intereses entre un individuo y la colectividad al conflicto entre colectividades, un enfrentamiento entre el grupo que disfruta de la comodidad, del bienestar, de la longevidad difícilmente mejorable y el de los que tienen necesidades primarias aún por resolver. La comunidad científica y las autoridades sanitarias nacionales y supranacionales deben superar una concepción individualizada de la salud.

A este fin puede ser útil el ejercicio de medidas de eficacia complejas, de extensión progresiva hasta una especie de mortalidad planetaria o de coste/efectividad global como patrón de medida de la eficacia real de una intervención *hinc et nunc* respecto a tantas necesidades que, desde siempre, no encuentran satisfacción de otra manera. Se trata, de hecho de extender a escala mundial una lógica adoptada ya en el ámbito de las poblaciones singulares. Se ha pasado, así, de episodios clínicos específicos (mortalidad coronaria) a otros más globales (mortalidad general), capaces de dar mayor información acerca del impacto real de una intervención de salud pública. Si se lograra satisfacer necesidades tan distintas de las expresadas por la mayoría, demasiado atenta a evitar el menor riesgo de cada uno, se podrían alcanzar eficacias y relaciones coste/efectividad muy ventajosas respecto a sus equivalentes, de cálculo muy difícil, en nuestro sujeto-modelo de mediana edad, sano aunque sometido a una moderada tensión y con un exceso de colesterol.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

THE STRATEGY OF PREVENTIVE MEDICINE. G. Rose, Oxford University Press, Oxford, 1993.

CAUSE/EFECTI IN MEDICINA. R. Marchioli, G. Tognoni. Il Pensiero Scientifico, Roma, 1994.

MISURE DI SALUTE E DI VITA. D. Labrozzi. Il Pensiero Scientifico, Roma, 1995.

EVIDENCE-BASED MEDICINE: WHAT IT IS AND WHAT IT ISN'T. D. L. Sackett, W. M. C. Rosenberg, J. A. Muir Gray, R. B. Haynes, W. S. Richardson, en *British Medical Journal*, vol. 312, págs. 71-72, 1996.

EVIDENCE-BASED MEDICINE: AN INCOMPLETE METHOD FOR INFORMING TREATMENT CHOICES. A. Maynard, en *Lancet*, vol. 349, págs. 126-128, 1997.

INFORMATION NEEDED TO DECIDE ABOUT CARDIOVASCULAR TREATMENT IN PRIMARY CARE. J. Robson, en *British Medical Journal*, vol. 314, págs. 277-280, 1997.

FINANCIAL INTERESTS CONSTRAIN DRUG DEVELOPMENT. S. Garattini, en *Science*, vol. 275, pág. 287, 1997.

Etica del uso de placebo en investigación clínica

La utilización de placebos en investigación clínica ha sido crucial para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. Pero su empleo exige una cuidadosa valoración ética

Francisco J. de Abajo y Diego M. Gracia

La introducción del placebo en la investigación clínica constituyó un paso decisivo en la aplicación del método experimental en medicina. Desde el punto de vista de la eficiencia estadística y de la claridad en la interpretación de los resultados, las ventajas que aporta un grupo control con placebo son notables. Pero al mismo tiempo, por tratarse de sujetos humanos, el recurso al placebo plantea problemas éticos que exigen una cuidadosa valoración para decidir en qué casos estaría justificado.

Para el objetivo que nos ocupa podemos convenir en llamar placebo a la sustancia que por sí misma carece de acción terapéutica y que se utiliza en investigación clínica como un control para probar la eficacia de un fármaco o bien de cualquier otro procedimiento terapéutico.

La evolución semántica del vocablo es muy interesante. *Placebo* ("yo complaceré") es forma de futuro del verbo latino *placere* ("complacer"). Su empleo como sustantivo tiene un origen curioso: el salmo 114, versículo 9, de la Vulgata (salmo 116: 9 de la notación actual), que se incorpora a la liturgia de la Iglesia Católica Romana en el rezo de vísperas del oficio de difuntos. Dice ese versículo: *Placebo Domino in regione vivorum* ("Complaceré al Señor en la región de los vivos"). En el siglo XII, el oficio de vísperas de difuntos se designaba en inglés como *placebo*, honor que se hacía a la primera palabra de la antífona antes mencionada. Por extensión, desde el siglo XIV los cantores del salmo pasaron a denominarse "cantores de placebo". A partir de aquí la palabra se enriquece en su significado pasando a un contexto profano, cuando se aplica para describir la forma de actuar de cortesanos, aduladores y personas complacientes en general.

Esa acepción de halago o complacencia probablemente se incorpora pronto en medicina, aunque la primera definición en que se recoge no llega hasta 1785. En la edición del *Motherby's New Medical Dictionary* de ese año el placebo se describe como "método banal o medicina". En 1811, en el *Hooper's Medical Dictionary* es ya el "calificativo que se aplica a toda medicación prescrita más para complacer al enfermo que para resultarle útil", decantando el significado moderno del término e indicando la importancia del elemento psicológico. El carácter inerte del placebo no aparece referido hasta finales del siglo XIX.

En 1950, A. D. Berg disocia los conceptos *placebo* y *efecto placebo*, este segundo de alcance más general. Toda intervención terapéutica, incluido el propio placebo, tiene efecto placebo. Walter Modell, uno de los pioneros de la farmacología clínica, hizo famosa la definición de efecto placebo como "la única característica común a todos los medicamentos". De una manera más estricta entenderemos aquí por efecto placebo el cambio favorable que se induce en la enfermedad de un paciente atribuible al carácter simbólico de la intervención curativa. La utilización de placebo en investigación clínica se propone básicamente controlar este fenómeno.

Sin embargo, no todo el efecto favorable que se observa en el grupo de pacientes al que se ha administrado placebo es efecto placebo. En realidad, el cambio a mejor producido obedece a la combinación de factores diversos. Además del carácter simbólico de la intervención curativa, deben mencionarse la propia evolución natural de la enfermedad, el fenómeno conocido como regresión a la media (cualquier parámetro que presente variaciones en sus valores tenderá hacia el valor medio con el tiempo), las variaciones aleatorias y la intervención de factores desconocidos. Separar estos efectos del efecto terapéutico específico es lo que se pretende utilizando como control un placebo.

De más reciente incorporación es la expresión *efecto nocebo*, que alude a las reacciones adversas asociadas con sustancias inertes. Abarca, por extensión, los efectos psicológicos negativos que pueden acompañar a tratamientos medicamentosos.

El efecto placebo es tan antiguo como la propia terapéutica. La capacidad curativa o el alivio proporcionado a los pacientes de la mayoría de los remedios conocidos hasta bien entrado el siglo XX, debíanse en buena medida al efecto placebo: el excremento de cocodrilo, el cuerno del unicornio, la mandrágora, la carne de víbora, el esperma de rana, las sangrías, son sólo algunos ejemplos llamativos de tratamientos muy populares en dis-

FRANCISCO J. DE ABAJO Y DIEGO M. GRACIA colaboran desde hace años en el estudio bioético de la investigación clínica. De Abajo, que se doctoró en medicina por la Universidad de Alcalá de Henares y completó sus estudios de bioética en la Universidad Complutense de Madrid, trabaja en el Centro Nacional de Farmacobiología del Instituto de Salud Carlos III, de Majadahonda. Gracia, catedrático de historia de la medicina de la Universidad Complutense de Madrid y autor de varios libros sobre bioética, es miembro de la Academia Española de Medicina.

tintas épocas, exentos de actividad terapéutica propia. Pero en ninguna de esas panaceas había conciencia del efecto placebo. Éste comienza a comprenderse en el Renacimiento, cuando se observa el papel que puede desempeñar la imaginación en el origen y curso de las enfermedades. Michel de Montaigne, en pleno siglo XVI, dedica uno de sus ensayos a este tema y describe diversos casos, algunos vividos por él mismo, de enfermedades inducidas o aliviadas por la imaginación:

"Cierto caballero, habiendo convidado a un grupo de personas, vanaglorióse por broma, a los tres o cuatro días, de haberles hecho comer una empanada de gato. Ello era incierto, mas una joven de las del festín experimentó tal horror que, cayendo en



1. *LA GENTE QUIERE SER ENGAÑADA*, se lee en latín y en holandés en la inscripción inferior. El grabado, de principios del siglo XVII, muestra a un vendedor ambulante de preparados medicinales. La mayoría de estos remedios carecían de acción terapéutica específica pero el efecto placebo, entre otros factores, les hacía pasar por eficaces y permitía mantener el negocio (prósperamente, a juzgar por el aspecto del vendedor). El grabado es de Jan van de Velde y pertenece a la colección *Ars Medica* del Museo de Arte de Filadelfia.

una gran fiebre y descomposición de vientre, fue imposible salvarla."

Las enfermedades que son fruto de la imaginación pueden obtener alivio inmediato si se incide sabiamente sobre la idea que la origina. Refiere el propio Montaigne: "Una mujer, creyendo que se había tragado un alfiler con el pan, gritaba y se atormentaba como si tuviese en la garganta un dolor insoportable, pues creía que el alfiler se le había clavado allí. Como no había por fuera alteración ni muestra del caso, un hombre discreto, imaginando que aquélla era mera fantasía y suposición, tiró del trozo de pan con que la mujer se había atragantado, hízole vomitar y echó a hurtadillas en lo vomitado un alfiler torcido. La mujer, creyendo haber devuelto el alfiler, sintióse al punto libre de su dolor."

Pero hasta las postrimerías del siglo XVIII nadie intenta separar el efecto placebo del efecto terapéutico específico de los tratamientos al uso. Es entonces cuando se realizan los primeros estudios científicos. Uno de los más famosos fue el que llevó a cabo cierto médico escocés de apellido Haygarth. Se habían puesto de moda por aquella época unas varillas metálicas que, merced a ciertas propiedades eléctricas, se decían útiles para una gran variedad de enfermedades. Llevaban el nombre de su creador, los *tractores de Perkin*. El tratamiento era recomendado por médicos eminentes y su éxito fue tan grande, que acabó por crearse en Londres un instituto sobre "Perkinismo". Haygarth, movido por un escepticismo digno de admiración, sometió el tratamiento a un experimento que describió en su libro *De la imaginación como causa y cura de los trastornos del cuerpo*. Hizo que cinco pacientes utilizaran "varillas" de imitación hechas de madera y todos, excepto uno, resultaron aliviados de sus problemas. Al día siguiente repitió el tratamiento con las varillas auténticas y obtuvo similares resultados, lo que le llevó a concluir que "la mente ejerce efectos poderosos sobre el estado del organismo, y con frecuencia este factor ha pasado inadvertido en el tratamiento de las enfermedades".

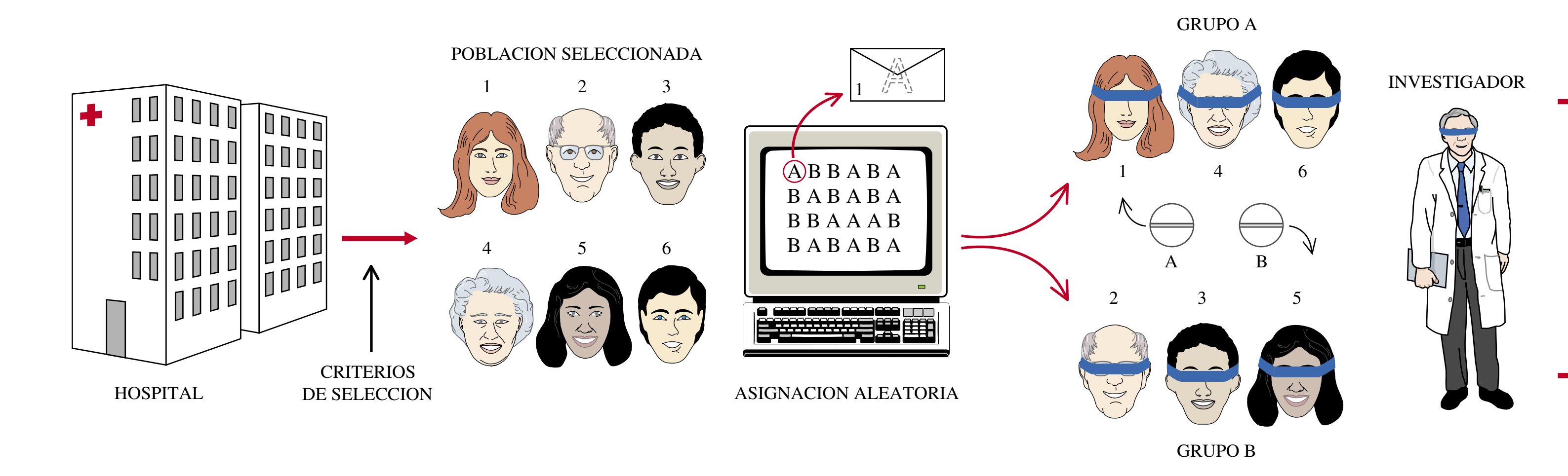
En 1865 el fisiólogo francés Claude Bernard publica su *Introducción al estudio de la medicina experimental*, el libro canónico de la medicina científica moderna. Subraya allí la necesidad de la experimentación comparativa como una regla general y absoluta: "Sería fácil probar que casi todos los errores experimentales provienen de que se ha descuidado el juzgar comparativamente los hechos, o de que se han creído comparables casos que no lo eran."

Unos años antes, en 1834, otro médico francés, Pierre Charles Louis, uno de los fundadores de la epidemiología, había propuesto el *método numérico* para evaluar los tratamientos médicos, insistiendo en el carácter comparativo de la investigación clínica: "Para asegurarnos de la superioridad de un tratamiento sobre otros en cualquier enfermedad, y teniendo en cuenta las diferentes circunstancias de edad, sexo y constitución, no cabe duda que hemos de hacerlo preguntando si bajo estas circunstancias el número de individuos que se cura por un medio es mayor que el que se cura por el otro. Aquí, de nuevo, es necesario contar. Y en gran parte es por la rara o nula utilización que hasta ahora se ha hecho de este método, por lo que la ciencia de la Terapéutica sigue siendo tan incierta." Además, añade Louis, para que los cálculos sean correctos es necesario "conocer con precisión en qué período de la enfermedad se ha comenzado el tratamiento y, especialmente, tenemos que conocer el curso natural de la enfermedad".

La corriente experimental de Bernard y la numérica o estadística de Louis evolucionaron de forma independiente y en cierto sentido opuesta. Bernard despreciaba la aplicación de la estadística para obtener conocimiento científico: "La estadística jamás ha enseñado nada acerca de la naturaleza de los fenómenos. Aplicaría también lo que acabo de decir a todas las estadísticas hechas para conocer la eficacia de ciertos remedios en la curación de las enfermedades."

Ambas líneas de pensamiento, no obstante, confluyen en la primera mitad del siglo XX para dar lugar al *patrón oro* de la investigación clínica moderna: el ensayo clínico controlado. La cada vez más evidente necesidad de utilizar sujetos controles en los ensayos clínicos desembocó en la utilización de sustancias o intervenciones inertes para la enfermedad en estudio. La primera vez que se utiliza un placebo como control con esta idea parece haber sido en el ensayo publicado en 1927 por F. R. Ferguson, A. F. C. Davey y W. W. C. Topley en el que se comparaba una vacuna para el catarro común con suero salino, desconociendo los individuos experimentales a qué tratamiento habían sido asignados.

Desde entonces, la utilización de placebos como controles en los ensayos clínicos fue la norma en una metodología que culmina a finales de la década de los cuarenta con la aportación fundamental de Austin Bradford Hill: la asignación aleatoria individual, ciega e impredecible de los tratamientos a comparar, que es sin duda el mejor procedimiento



para tratar de hacer homogéneos (lo más similares posible) los grupos de comparación. En los años cuarenta comienza también el estudio científico del efecto placebo, los factores que lo condicionan, sus bases psico-fisiológicas y su farmacología.

En nuestros días, la utilización más habitual del placebo es como comparador. Mediante su empleo, se busca obtener una medida del ruido de fondo provocado por factores distintos de la intervención experimental propiamente dicha. Para someter a prueba la eficacia de un fármaco, suelen disponerse dos grupos: el grupo control y el grupo experimental. Los pacientes que cumplen determinados criterios de selección, y una vez que han otorgado su consentimiento, se asignan de forma aleatoria a uno u otro. Al cabo de un tiempo, especificado de antemano en el protocolo, se evalúa la respuesta sobre los parámetros clínicos o analíticos que se juzguen más apropiados. El placebo facilita, asimismo, que el estudio pueda realizarse bajo condiciones ciegas. El ensayo en cuestión será a "simple ciego", si sólo es el paciente quien desconoce la identidad de los tratamientos que se comparan; será a "doble ciego", si, además, la ignora el investigador que evalúa la respuesta (para conseguir esto, las características organolépticas de los tratamientos a comparar han de ser indistinguibles). Pensemos, por ejemplo, que se quiere conocer la eficacia de un fármaco para el tratamiento de la úlcera duodenal. El parámetro de evaluación lo fijamos en la desaparición de la úlcera duodenal visualizada por endoscopia digestiva a las 4 semanas de iniciado el tratamiento. La proporción p de pacientes curados en el grupo experimental se compara con la proporción q de pacientes curados en el grupo control. Para conocer si la diferencia p-q puede ser explicada meramente por el azar se somete el resultado a pruebas de significación estadística. Si la probabilidad de que el azar explique la diferencia observada es menor de 0,05, se acepta el resultado como estadísticamente significativo. La significación estadística depende de manera fundamental del tamaño de la muestra. En general éste deberá ser tanto mayor cuanto más pequeña sea la diferencia p-q que nos interesa demostrar como estadísticamente significativa. Otra cuestión es si la diferencia además es clínicamente relevante. Ambos criterios son necesarios para dar valor al resultado obtenido.

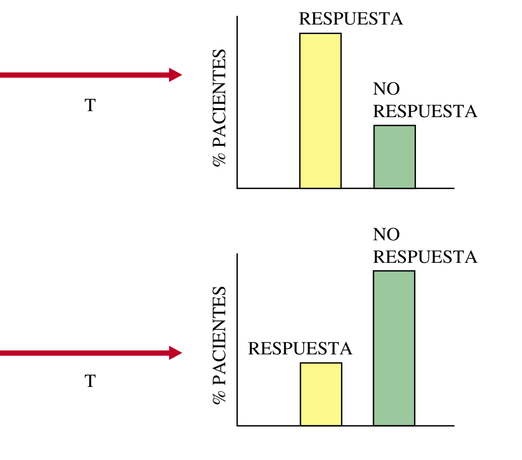
La utilización de un placebo en el grupo control permite atribuir significación estadística al efecto de la intervención experimental con un menor número de pacientes del que sería necesario si como grupo control se utilizara un tratamiento más eficaz que el placebo. Por ello se dice que el uso de un placebo como control hace la investigación más eficiente desde un punto de vista estadístico.

Cuando se pretende comparar dos medicamentos cuya posología o vía de administración son diferentes, y conviene hacerlo en condiciones ciegas, el placebo puede utilizarse como complemento para hacer indistinguible la intervención experimental de la intervención control. Esta técnica se denomina doble-simulación (*double-dummy*). Por ejemplo, cuando se quiere comparar un tratamiento *A* que se administra una sola vez al día (por la mañana) con un tratamiento *B* que se administra 2 veces al día (mañana y noche), se puede conseguir el enmascaramiento haciendo que los pacientes tratados con *A* reciban por la noche un placebo de iguales características al tratamiento activo.

Otra aplicación del placebo es en los ensayos clínicos cruzados que se caracterizan porque cada paciente recibe todos los tratamientos que se comparan. Dicho de otro modo, cada sujeto actúa como autocontrol. La secuencia que recibe cada sujeto se determina de forma aleatoria. Las ventajas de este diseño respecto al tradicional de grupos paralelos son la reducción de la variabilidad en las respuestas y el ahorro notable de muestra, pero sus limitaciones restringen bastante el campo de aplicación de este método. Una de las principales limitaciones es el llamado "efecto secuencia", que ocurre cuando el efecto del tratamiento que se aplica en primer lugar persiste cuando se aplica el segundo. Con la intención de reducir esta influencia y tratar de recuperar las condiciones basales antes de administrar el segundo tratamiento, es costumbre realizar un período de lavado en el que con frecuencia se emplea un placebo de características similares a las de los medicamentos del ensayo. El período de lavado debe durar el tiempo suficiente para que desaparezca del organismo la mayor parte del medicamento del primer período.

Se recurre también al placebo en algunos ensayos, antes de la asignación aleatoria, cuando deba procederse a la estabilización de la situación del paciente, el lavado de tratamientos previos o la identificación de los pacientes que han dado respuesta positiva al placebo. Este período es conocido como de pre-inclusión (*run-in*). Es frecuente emplear esta técnica en los ensayos que se realizan en hipertensión, depresión o angina de pecho. En determinadas investigaciones se sustituyen los tratamientos sometidos a comparación por un placebo al final del ensayo, con la idea de poner de manifiesto posibles efectos de retirada (efecto rebote, o bien un síndrome de abstinencia física). Esta técnica conviene emplearla en general con los medicamentos que actúan sobre el cerebro.

La utilización de los seres humanos en la investigación biomé-



2. EN UN ENSAYO CLINICO los sujetos que presentan las características exigidas por los criterios de selección establecidos en el protocolo y que han otorgado su consentimiento voluntario e informado se asignan aleatoriamente a uno de los grupos de comparación. Para ello, se ha elaborado previamente una tabla en la que los tratamientos codificados como A y B se encuentran ordenados al azar. Los investigadores que van a tratar a los pacientes no tienen acceso a esta tabla. A partir de aquí se preparan sobres cerrados numerados en cuyo interior se encuentra el código del medicamento que ha de administrarse. Los tratamientos A y B son indistinguibles en sus características organolépticas (forma, color, sabor, olor, consistencia...) para asegurar que ni los pacientes ni los investigadores puedan identificar qué medicamento corresponde a cada uno (el ensayo se llama por ello doble-ciego). Al cabo de un tiempo T se mide la respuesta y se compara el resultado entre ambos grupos.

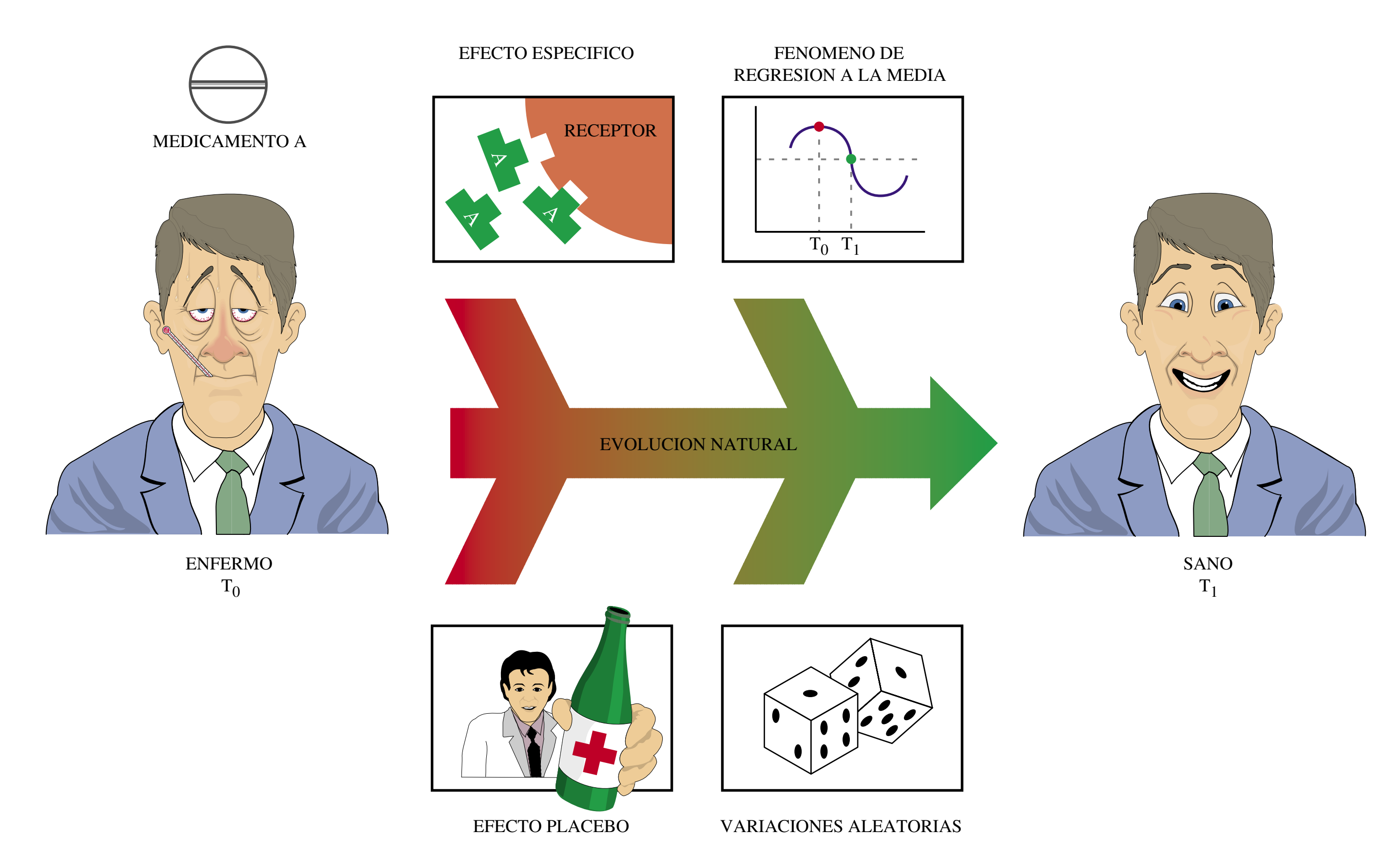
dica ha planteado siempre graves dilemas morales. Para abordar esa cuestión, sin embargo, conviene tener claro desde un comienzo que un producto diagnóstico o terapéutico está en fase de investigación cuando aún no se conocen sus propiedades. O lo que es lo mismo, cuando su carácter diagnóstico o terapéutico es sólo potencial. Ese tipo de investigación no se propone mejorar la condición biológica del sujeto en que se realiza, sino sólo aumentar nuestro conocimiento sobre el producto. Por supuesto, ello podrá repercutir en beneficio de muchedumbres de personas en el futuro, pero en el momento de la investigación el único objetivo posible es aumentar nuestro conocimiento sobre la sustancia. Ahora bien, ¿se puede someter a un hombre a riesgos notables, mortales quizá, con el simple propósito de aumentar nuestro conocimiento sobre algo? Ese es el problema ético.

A lo largo de la historia de la medicina este problema se ha resuelto de diferentes modos. El cronista romano Celso, del siglo I de nuestra era, cuenta que en Alejandría se utilizaban condenados a muerte para tales menesteres, ya que en los demás casos se consideraba la experimentación moralmente injustificable, al menos si suponía riesgo de muerte. En los albores de la medicina experimental, Bernard echa mano de otro criterio ético y afirma que nunca está justificado actuar en el cuerpo de un ser humano vivo más que para buscar su propio beneficio. Bernard justifica la investigación en animales y en cadáveres, pero no la investigación en humanos que no sea compatible con un objetivo directamente terapéutico. Más recientemente, William Osler y otros han defendido que la experimentación en seres humanos es moralmente permisible si y sólo si éstos la aceptan voluntariamente, una vez informados sobre los riesgos.

La verdad es que la puesta a punto de la metodología del ensayo clínico y el incremento exponencial de la investigación clínica han planteado en nuestro siglo este tema con particular crudeza, sobre todo a partir de los experimentos en campos de concentración nazis y de las denuncias realizadas en los años sesenta, especialmente en los Estados Unidos, de investigaciones poco éticas.

La moderna ética del ensayo clínico comenzó a sistematizarse en los años setenta, y encontró su primera formulación en 1978, en el Informe Belmont (así llamado por la ciudad donde se realiza) con que acabaron los trabajos de la Comisión Nacional para la Protección de los Sujetos de Investigación en las Ciencias Biomédicas y del Comportamiento, creada por el Congreso de los Estados Unidos en julio de 1974. A partir de entonces, ha ido enriqueciéndose con nuevas aportaciones, hasta constituir un cuerpo de doctrina que en síntesis viene a decir lo siguiente.

La vida moral de los seres humanos se rige siempre por unos criterios generales que actúan a modo de *canon* de medida de las acciones, a modo de criterio de su bondad o malicia. Toda



3. LA ACCION CURATIVA de los medicamentos es debida a su efecto farmacológico específico, pero también pueden contribuir, de modo variable según los casos, otros factores. El efecto placebo está mediado por mecanismos psicofisiológicos y se debe al carácter simbólico de curación que poseen tanto el medicamento como el propio médico. Los pacientes con enfermedades de evolución clínica oscilante visitan al médico con más frecuencia en los períodos de mayor intensidad, a partir de los cuales la evolución natural es la mejoría, aun sin tratamiento. Otras veces intervienen factores desconocidos que interpretamos como variaciones aleatorias. Separar todos estos efectos del efecto farmacológico específico es el objetivo de utilizar un placebo como control en investigación clínica.

acción tiene que compararse siempre con un patrón de medida, a fin de poder juzgar su corrección. Dicho canon o patrón es necesariamente un criterio racional. De éstos, el más clásico es el principio de reciprocidad, según el cual una acción no puede ser considerada buena si tiene un carácter asimétrico tal, que no desearíamos el intercambio de papeles con quien sufre sus consecuencias. La fórmula clásica de ese principio de reciprocidad es la llamada Regla de Oro, que manda no hacer a los demás lo que no queramos que éstos nos hagan a nosotros.

Otro principio canónico es el de universalizabilidad, según el cual quien afirma una acción concreta como correcta o incorrecta tiene que estar afirmando a la vez que todas las acciones exactamente iguales a la juzgada deberían tomarse también por correctas o incorrectas. No se trata de atribuir a tales preceptos validez universal por sí mismos, sino de que los seres racionales deberían convenir en concedérsela. Los preceptos, aunque no sean en sí universales, gozan de una pretensión racional de universalizabilidad.

Los principios de reciprocidad y universalizabilidad del canon llevan fácilmente a formular la proposición general de que los seres humanos deben ser respetados y que, por tanto, no pueden ser utilizados como simples medios para los objetivos particulares de cualesquiera otros. Los sujetos humanos deben considerarse siempre fines. En la actualidad hay una fuerte tendencia a ampliar esta fórmula dando cabida a los animales o al conjunto de la vida. Pero en cualquier caso nadie duda que debe abarcar al menos a todos y cada uno de los seres humanos.

Utilizando expresiones que proceden del filósofo Immanuel Kant, cabría decir que los seres humanos son fines y no medios, y que tienen dignidad y no precio. Éste es, en esencia, el canon de moralidad. Un canon que, como Kant señaló, posee carácter meramente formal, lo que en su filosofía significa que carece de contenido concreto. Ni el principio de reciprocidad, ni el de universalizabilidad, ni tampoco la proposición universal de respeto de los seres humanos que de aquellos se deriva tienen contenido deontológico. No dicen cómo hay que actuar. Afirman que una actuación sólo podrá considerarse correcta si cumple con esos criterios. Estos definen, pues, el "qué", pero no el "cómo". Dicen que hay que respetar a los seres humanos, pero no cómo hay que respetarles, con qué acciones.



4. *CLAUDE BERNARD ET SES DISCIPLES*, famoso cuadro de Léon L'Hermite. Bernard publicó en 1865 la *Introducción al estudio de la medicina experimental*, el libro canónico de la medicina moderna, donde subraya la necesidad de la experimentación comparativa.

A diferencia del canon, las normas de acción sí presentan contenido material y deontológico. Las normas de acción afirman la corrección o incorrección de ciertas conductas concretas, como no matar, no mentir, etc. Ahora bien, entre el canon y las normas concretas hay un gran espacio, que necesita de una cierta mediación. En la terminología kantiana esa mediación la desempeñan las "máximas", o principios subjetivos de la acción. Las máximas no son normas, sino un guión, un "esbozo" de lo que deben ser las normas o de las condiciones que deben cumplir éstas.

Los miembros de la Comisión Nacional estadounidense citada prestaron particular atención a ese esbozo general de las proposiciones deontológicas. Esbozo cuyos perfiles precisaron en tres principios generales: respeto por las personas, beneficencia y equidad. Tom L. Beauchamp y James F. Childress añadieron en 1979 un cuarto principio, el de nomaleficencia. Beauchamp y Childress denominaron principio de autonomía al de respecto por las personas, y de justicia al de equidad.

En adelante, se aceptaría que el respeto de los sujetos de experimentación exigiría siempre cumplir con estos cuatro principios: autonomía (respetar las preferencias de las personas), beneficencia (respetar sus ideales de vida buena), no-maleficencia (no hacer daño) y justicia (distribuir equitativamente las cargas y los beneficios). Toda norma que quiera ser moral deberá cumplir con ellos. Esto no significa que carezcan de excepciones.

Los cuatro principios se han venido considerando del mismo nivel. No habría, pues, orden jerárquico entre ellos. Sin embargo esto choca con una tradición inveterada, que considera que los deberes morales son de dos tipos muy distintos, unos negativos o de prohibición y otros positivos o de virtud. Los primeros tienen la característica de ser exigibles a todos por igual, razón por la que tienden a convertirse en derecho y llevar asociada una pena. El no matar es una norma derivada del principio de no-maleficencia, y el no robar otra derivada del principio de justicia. Estos dos principios cubren toda el área de los deberes negativos o de prohibición, que por ser exigibles a todos por igual y tener carácter público se han denominado tradicionalmente deberes perfectos.

Por el contrario, los principios de autonomía y beneficencia son de gestión privada. Nadie puede escudarse en la autonomía para matar a otro, pero sí para organizar su vida de acuerdo con sus preferencias y valores, una vez respetadas las normas

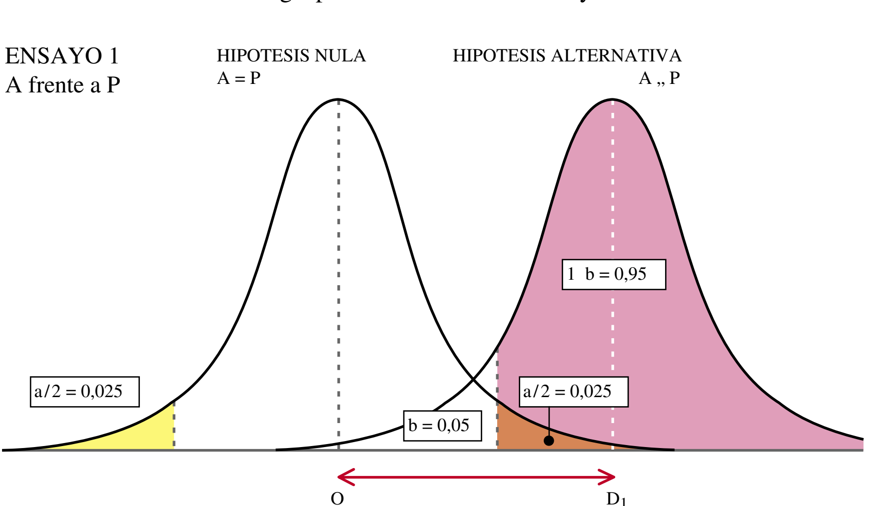
comunes que sirven de marco a la convivencia.

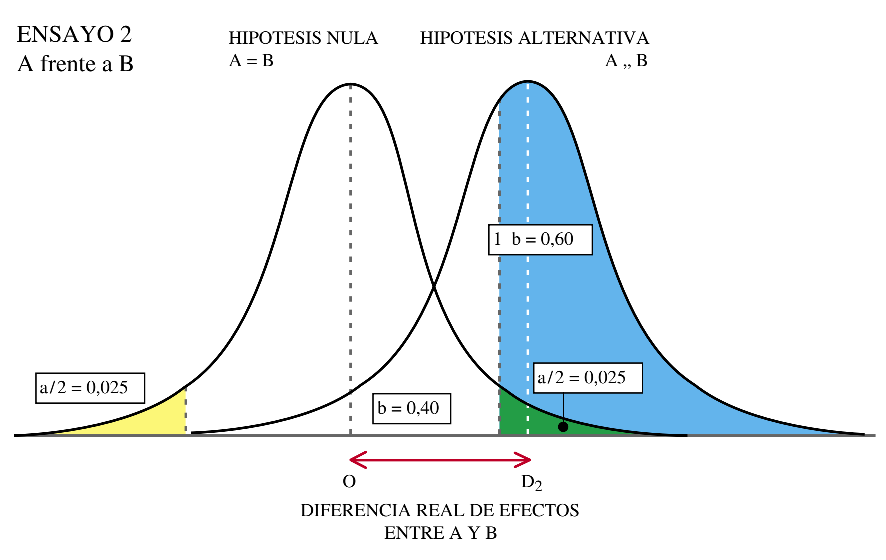
Por supuesto, *genéticamente* todos los otros principios surgen del de autonomía, ya que sin ella ningún otro podría existir. Pero una vez que los individuos de un grupo social elevan a la categoría de marco un precepto como el de no matar o el de no robar, los individuos concretos han de acatar la norma, aun en el caso de que quieran hacer lo contrario. Si, pues, *genéticamente* la autonomía y la beneficencia son los principios primarios, y la no-maleficencia y la justicia tienen carácter derivado, una vez establecidos estos últimos, tienen una *jerarquía* superior a los primeros, de tal modo que su exigibilidad no depende ya de la voluntad individual.

Puesto que los principios de no-maleficencia y justicia obligan con independencia de la opinión y la voluntad del sujeto, se dice que están a un nivel superior (llamémosle nivel 1) que los de autonomía y beneficencia (nivel 2). Se establece en el nivel 1 que todos los hombres deben ser tratados con igual consideración y respeto, tanto en el orden biológico (no-maleficencia) como en el orden social (justicia). Ambos principios explicitan la universalidad de la ética. Para caracterizar a este nivel moral regido por los principios de no maleficencia y justicia se habla de ética de mínimos, pues se nos puede obligar por ley a su cumplimiento.

El nivel 2, en cambio, concierne al ámbito de lo privado. Cada individuo debe ser tratado de forma distinta, peculiaridad que deriva del respeto a la autonomía de las personas, a su sistema de valores y a su idea de bienestar (beneficencia). El nivel 2 es el de la ética de máximos, que depende siempre del propio ideal de perfección y felicidad que nos hayamos marcado.

El nivel 1 tiene prioridad sobre el nivel 2. Aunque se contara con el consentimiento del paciente, por ejemplo, no estaríamos legitimados para llevar a cabo sobre él una investigación maleficente o injusta. Puede servirnos de ejemplo el tristemente famoso estudio de Tuskegee, llamado así por la ciudad del estado de Alabama (Estados Unidos) donde se realizó. El estudio pretendía conocer la historia natural de la sífilis no tratada. Para ello los investigadores seleccionaron a hombres negros de áreas rurales que tenían la enfermedad. El estudio comenzó en los años treinta antes de que la penicilina estuviera disponible, pero se mantuvo mucho tiempo después de que este antibiótico fuera un tratamiento habitual. Este estudio era a todas luces maleficente y además injusto (¿por qué sólo negros, y analfabetos en su mayoría, si la enfermedad no afectaba sólo a ellos?) y por tanto rechazable aun cuando los pacientes hubieran consentido con la investigación. Pero la realidad es que esto tampoco ocurrió: a los pacientes se les privó del tratamiento y de la

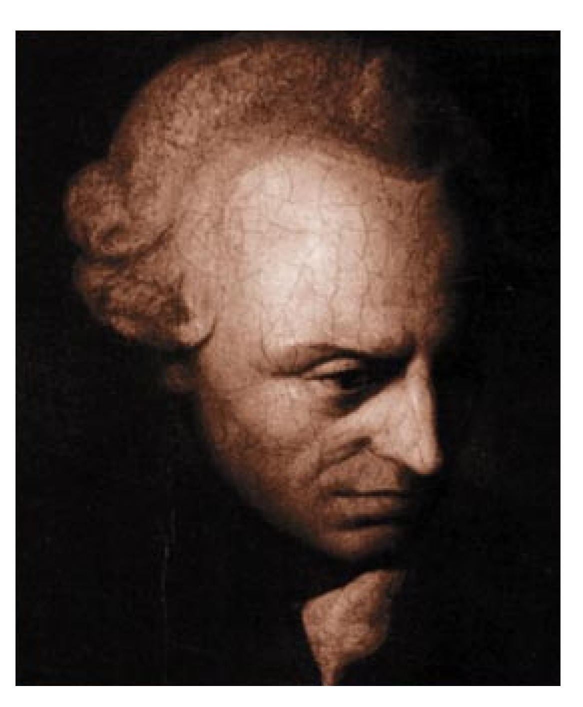




5. LA UTILIZACION DE UN PLACEBO (P) en vez de un control activo (B) facilita la demostración de eficacia del medicamento experimental (A). Si un ensayo clínico se repitiera infinitas veces y se fueran anotando los valores obtenidos en el eje de abscisas y sus frecuencias respectivas en el eje de ordenadas, éstas se distribuirían siguiendo una campana de Gauss. La dispersión de resultados en torno al efecto real del medicamento se debería al azar y es el precio que hay que pagar por trabajar con muestras. En la figura se representa la distribución de probabilidades de los posibles resultados de los ensayos 1 y 2 que el azar explicaría en las dos hipótesis operativas posibles: la hipótesis nula que afirma la igualdad de los tratamientos (diferencia $D = 0$) y la hipótesis alternativa ($D \neq 0$). Obsérvese que en ambos casos la probabilidad de que un determinado resultado se deba al azar disminuye a medida que se aleja del valor central. Cuando esta probabilidad (o error α) es inferior a 0,05 se acepta por convención que dicho resultado es estadísticamente significativo. El error α representaría la probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo cierta. El error β la probabilidad de no rechazar la hipótesis nula cuando es falsa; su complementario $1-\beta$ indicaría el poder que tiene el ensayo de detectar como significativa una diferencia que realmente existe. La utilización de un placebo (*ensayo 1*) hace que la diferencia sea mayor ($D_1 > D_2$) y pueda detectarse con un poder de contraste superior a si se utilizara un control activo (*ensayo 2*) para un mismo error α y un mismo tamaño muestral.

información y no se les dio la oportunidad de consentir. Este estudio se hizo público en 1972 y constituyó uno de los mayores escándalos de la historia de la ética de la investigación clínica posterior a Nuremberg.

Hay que respetar en todas las situaciones ese esbozo moral, expresado en los cuatro principios señalados. Sin embargo, en cuanto esbozo tiene carácter general. Cuando se trata de aplicarlo a una situación determinada podría suceder que las consecuencias de su puesta en obra fueran peores que las que resultarían de su no aplicación. Esas situaciones de excepción pueden afectar lo mismo a la aplicación de los principios de no-maleficencia y justicia que a los principios de autonomía y beneficencia. Citemos la mentira piadosa como ejemplo de excepción al nivel 1 y la investigación en personas inconscientes y en situaciones de urgencia, cuando se espera un beneficio para ellas que no puede conseguirse de otro modo, como ejemplo de excepción al nivel 2.



6. SOSTENIA IMMANUEL KANT que los seres humanos son fines y no medios, y que tienen dignidad y no precio. Kant, que aparece aquí en un retrato al óleo, ha ejercido una poderosa influencia en la filosofía moral de los últimos doscientos años.

Vemos, pues, que todo razonamiento moral consta de tres pasos: sistema de referencia (el canon de moralidad), esbozo (los principios) y experiencia (la valoración de las consecuencias). Sólo al final de este proceso se puede considerar que una decisión o un acto está justificado racionalmente.

Detallemos el desarrollo aplicado del esbozo moral. Cualquier elemento éticamente relevante que haya que tomar en cuenta en la investigación clínica entrará en el nivel 1 o en el nivel 2 de lo que hemos llamado esbozo moral. Así, los principios de no-maleficencia y justicia exigen que la investigación sea correcta desde un punto de vista técnico, que se lleve a cabo por investigadores competentes, que la selección de los pacientes sea equitativa, que no se induzca daño a los sujetos salvo que se espere obtener un beneficio proporcional (relación beneficio-riesgo no desfavorable) y que exista un estado de incertidumbre o indeterminación clínica respecto a cuál de los tratamientos que se comparan sea mejor.

Por su parte, los principios de autonomía y beneficencia exigen que se informe verazmente a los sujetos de la realización de la investigación, de sus objetivos, beneficios y riesgos y se les pida su consentimiento a participar sin que medie coacción o influencia indebida, pudiendo revocar dicho consentimiento en cualquier momento. Exigen, además, proteger especialmente a los sujetos que por razón de inmadurez o enfermedad tengan su autonomía reducida, y finalmente exigen que se maximice el bienestar de los sujetos atendiendo a sus preferencias.

Dentro de todos esos elementos, los dos que atañen de manera más directa al empleo del placebo son la relación beneficio-riesgo y la situación de indeterminación clínica, ambos dependientes de los principios de no-maleficencia y justicia.

Empecemos por la relación beneficio-riesgo. No deben administrarse medicamentos ni realizar intervenciones, ya sean terapéuticas o diagnósticas, cuya relación beneficio-riesgo esperable para el paciente del ensayo sea desfavorable, según se juzga por la comunidad científica, o, en su defecto, por el propio médico. Cuando el riesgo es mínimo o inferior al mínimo, entendiendo por tal aquel que asumimos todos en las actividades normales de la vida diaria, un beneficio mínimo o incluso nulo sería compatible con el respeto al principio de no-maleficencia. Este es el punto de anclaje ético de la mal llamada investigación no terapéutica, aquella en la que no es esperable un beneficio para el sujeto de investigación (por lo que sería mejor llamarla investigación sin beneficio potencial). Un riesgo superior al mínimo requeriría un beneficio proporcional para el individuo. Si éste no existiera, pero de la investigación se derivara un beneficio importante para la sociedad y no hubiera alternativas de diseño válidas científicamente, podría valorarse la posibilidad de hacer una excepción. Sin embargo, sólo puede asumir la excepción, apelando al principio de justicia, el representante legítimo del bien común: el Estado.

El segundo elemento importante es que entre las intervenciones sometidas al ensayo debe darse una situación de indeterminación clínica (*clinical equipoise*). De acuerdo con Benjamin Freedman, "a tenor de los datos disponibles, una comunidad de médicos competentes estaría de acuerdo en ofrecer a sus pacientes cualesquiera de las estrategias de tratamiento evaluadas en un ensayo clínico debido a que ninguna de ellas se ha establecido como más apropiada". Robert J. Levine resume esa idea en una frase taxativa: "Es posible formular una hipótesis nula honrada." El concepto de indeterminación (o *equipoise*) debe extenderse también a las alternativas terapéuticas que quedan fuera del ensayo: ninguna de éstas debería tener mejor relación beneficio-riesgo que las que se someten a ensayo. Si así fuera, no habría *equipoise* entre las mismas. Este es el criterio que parece querer reflejar el punto II-3 de la Declaración de Helsinki:

"En cualquier estudio clínico, todo paciente, inclusive los de un eventual grupo control, debe tener la seguridad de que se le aplica el mejor procedimiento diagnóstico y terapéutico confirmado."

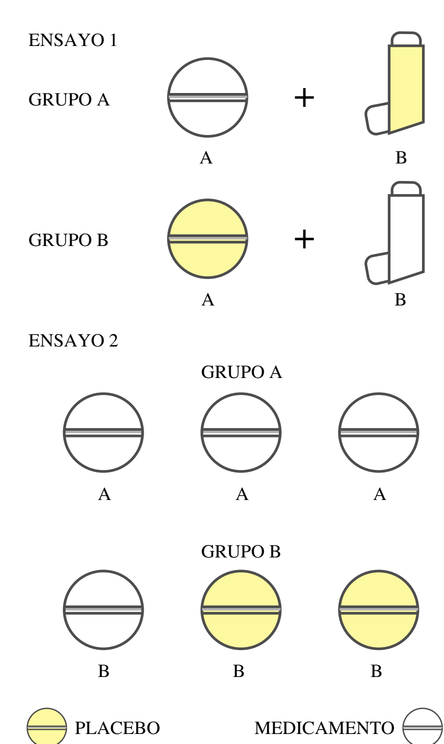
Pero el criterio de indeterminación clínica es sólo una forma de expresar el principio de no-maleficencia. No puede, por tanto, ir más allá del propio principio. Una investigación en la que no exista una indeterminación clínica real es maleficente porque entraña un exceso de riesgo evitable en las personas a las que se les ofrece el tratamiento inferior. Pero si el exceso de riesgo es inexistente o mínimo, la

falta de indeterminación clínica no puede considerarse maleficente. No se atentaría, pues, contra el nivel 1 y, por tanto, el problema del uso de placebo podría resolverse en el nivel 2 con un consentimiento informado apropiado.

La mayoría de los problemas éticos que el uso de placebo plantea en investigación clínica provienen de su uso como comparador. Básicamente se pueden agrupar en tres categorías principales: el engaño, el daño directo por la aplicación del placebo o de intervenciones cruentas y el daño indirecto por la omisión de un tratamiento potencialmente beneficioso. El empleo de placebo para los períodos de lavado, de preinclusión o de retirada plantea un cuarto problema: la interrupción de un tratamiento beneficioso para el paciente.

De la propia definición de placebo o de efecto placebo se desprende que el engaño es un componente sustancial del fenómeno. El engaño es la puerta de entrada del componente mágico que precisa el efecto placebo para producirse. Pero el engaño no es ético porque es maleficente. En la práctica clínica sólo puede justificarse desde un punto de vista ético como una excepción, cuando la comunicación de la verdad depara consecuencias peores que el engaño (la mentira piadosa). Pero en investigación clínica el engaño no debería ser un problema. No hay razones científicas que impidan informar al paciente de la existencia de una sustancia inerte entre las alternativas que puede recibir. No se busca que la investigación produzca un efecto placebo, sino que lo que se propone es controlarlo, que se reparta equitativamente entre los grupos de tratamiento. Sólo en aquellos ensayos cuyo objetivo es investigar los efectos de la administración de placebos y sus determinantes se plantea la necesidad del engaño, pero este tipo de investigación es muy especializado y resulta insignificante en el contexto clínico.

Para el resto de los casos, el engaño no es necesario y probablemente no es ni recomendable por razones estrictamente científicas; por tanto, no debería existir como problema ético. Ello no quita para que en la práctica pueda convertirse en problema si, por temor a que el paciente rechace su inclusión en el ensayo, no se le comunica que existe la posibilidad de recibir una sustancia inerte y de sus consecuencias. Como es obvio, este tipo de engaño no admite justificación ética.



7. TECNICA de doble simulación. Cuando se pretende comparar dos medicamentos A y B que se administran por una vía distinta, digestiva y respiratoria, por ejemplo (*ensayo 1*), o bien con una frecuencia diferente, tres veces al día respecto a una vez al día (*ensayo 2*), se utiliza un placebo para compensar las diferencias entre los dos grupos, permitiendo que el ensayo pueda hacerse a doble-ciego. Para facilitar la comprensión el placebo se ha coloreado de forma distinta, pero en realidad el placebo debe tener las mismas características organolépticas que el tratamiento activo.

Vayamos con la segunda categoría, el daño directo por la aplicación del placebo o de intervenciones cruentas. Debe aceptarse que, en general, los pacientes del grupo placebo van a obtener un beneficio escaso, si no nulo. Por ello Levine ha propuesto que la investigación que incluya un grupo placebo tenga, para este grupo, la consideración de no terapéutica (sin beneficio potencial). En estas investigaciones el riesgo a que debe someterse a los sujetos debe ser mínimo. Imaginemos un ensayo clínico que propone probar a largo plazo (por ejemplo, 54 semanas) un tratamiento intramuscular en pacientes diabéticos, que como se sabe son especialmente propensos a las infecciones, y que plantea un grupo control con placebo, también por vía intramuscular. El riesgo de la aplicación del placebo es superior al mínimo por lo que, en principio, sería inaceptable. Si no hubiera otra alternativa de diseño válida (control histórico, no tratamiento, tratamiento con placebo por vía oral) y la investigación fuera de gran relevancia social, podría valorarse hacer una excepción extremando las medidas de reducción del riesgo de los sujetos. Las mismas consideraciones se harían si el ensayo clínico planteara la realización de exploraciones cruentas.

El daño indirecto por la omisión de un tratamiento potencialmente beneficioso constituye el problema ético que más discusiones ha suscitado y el que resulta más arduo de resolver. ¿Es ético probar frente al placebo la eficacia de los nuevos antivirales para el tratamiento del sida, los antidepresivos, los antihipertensivos o los antiulcerosos, sabiendo que hay tratamientos eficaces en dichas áreas? Y cuando la enfermedad no tiene un tratamiento aceptado, pero es mortal, ¿es ético probar la eficacia de uno nuevo frente al placebo?, ¿siempre o con restricciones?

Retomemos el marco teórico antes formulado. La investigación en el grupo placebo debe considerarse sin beneficio potencial; por tanto, el riesgo, o mejor dicho, el exceso de riesgo que soportan estos pacientes debe ser mínimo. El exceso de riesgo depende de la frecuencia y magnitud de las complicaciones de la enfermedad o componente de la enfermedad a la que se destina el tratamiento que se ensaya; y depende también de la indeterminación clínica entre los tratamientos que se comparan en el ensayo (la intervención experimental y el placebo) y entre el placebo y los tratamientos alternativos ya validados y no sometidos a ensayo.

Cuando existe un verdadero estado de indeterminación clínica, esto es, la comunidad científica acepta que no hay pruebas suficientes para considerar que un tratamiento tiene una relación beneficio-riesgo superior al placebo en la enfermedad en estudio, entonces el uso de placebo no comporta un exceso de riesgo *a priori* con respecto a la aplicación del tratamiento experimental. En ensayos de larga duración, y en especial cuando se utilizan como parámetros de evaluación de la eficacia variables de las llamadas duras (mortalidad o complicaciones incapacitantes), deben realizarse análisis intermedios a lo largo del ensayo para valorar si la situación de indeterminación clínica de partida se mantiene o no. Es muy

importante fijar de antemano en qué momento se van a realizar los análisis intermedios y qué criterios se van a manejar para decidir la continuación o la suspensión del ensayo.

Los problemas más importantes que plantea el uso de placebo comienzan cuando no existe el estado de indeterminación clínica, porque hay tratamientos ya validados fuera del ensayo o porque el tratamiento supuestamente experimental ha superado el proceso de validación. Ante esas situaciones, la reacción mayoritaria suele ser considerar como no ético el uso del placebo. En su apoyo se suele acudir al punto II.3 de la Declaración de Helsinki antes referido.

Pero pongamos un par de ejemplos que nos ayuden en la reflexión. Imaginemos, en primer lugar, un ensayo en el que se compara con placebo la eficacia de un nuevo fármaco que puede tener propiedades analgésicas; para el ensayo, se eligen pacientes a los que se les ha extraído un molar. E imaginemos, en segundo lugar, un ensayo en el que se pretende conocer la eficacia en la úlcera duodenal de un nuevo fármaco cuyo mecanismo de acción es similar al de otros que ya existen en el mercado. Las ventajas de utilizar placebo en vez de un tratamiento activo serían básicamente la reducción del tamaño de muestra necesario y la estimación de los efectos no específicos, que en algunas situaciones clínicas como las referidas pueden ser muy importantes. La pregunta clave sería: ¿cuál es el exceso de riesgo que soportarían los pacientes tratados con placebo?

En el primer caso el exceso de riesgo que cabe anticipar se reduce a lo que podríamos catalogar como molestias. En el segundo ejemplo, en cambio, hay un exceso de riesgo de hemorragia, de perforación de la úlcera y, derivado de estas dos complicaciones, un exceso de riesgo de muerte. Es obvio que el segundo caso plantea un problema mayor. Las diferencias pueden ser aún más acusadas si en el primer ensayo introducimos medidas que permiten reducir la molestia sin obstaculizar la evaluación de la eficacia: por ejemplo, aplicando un tratamiento de rescate (un analgésico de conocida eficacia) si el paciente no mejora al cabo de dos horas. Si a esto se añade que el placebo puede aliviar el dolor en un 40 % de los sujetos, el riesgo que estimamos van a soportar por la privación del analgésico no parece que supere la consideración de mínimo, por lo que no lesionaría el principio de no-maleficencia. El problema del uso de placebo descendería entonces al nivel 2 y debería resolverse allí.



8. LOS TRES PASOS del razonamiento moral. Una decisión se justifica racionalmente cuando para adoptarla se ha seguido la secuencia mostrada en el esquema. El canon es meramente formal, es decir, sin contenido material concreto. El esbozo, en cambio, contiene las condiciones o máximas que deben cumplir las normas morales. El esbozo, como las hipótesis científicas, se contrasta con la realidad a través de la experiencia. Si las consecuencias de aplicar el esbozo, juzgadas desde el canon, resultaran peores que las de su no aplicación, se justificaría hacer una excepción al esbozo hasta que pudiéramos elaborar otro mejor.

El segundo ensayo, por el contrario, no pasaría del nivel 1, ya que su riesgo se consideraría superior al mínimo. Una opción alternativa a estudiar sería la de utilizar una variable sustitutoria como indicador o predictor de la curación de la úlcera y cuya aplicación permitiera reducir el riesgo al mínimo: por ejemplo si la medición del *p*H gástrico fuera un buen indicador de la curación. Pero si finalmente el exceso de riesgo se considera superior al mínimo sólo quedará como posible justificación la vía de la excepción al nivel 1 por razones muy importantes de justicia (interés social de la investigación), después de ponderar la validez de los diseños alternativos y su factibilidad.

¿Qué decir del daño directo por la interrupción de un tratamiento beneficioso? Se trata del problema que plantea habitualmente la utilización de placebo en los períodos de preinclusión, de lavado intermedio o de retirada. La evaluación del riesgo debe tener en cuenta las posibles complicaciones de la enfermedad no tratada y el posible efecto de retirada. Un factor muy importante a tener en cuenta es el tiempo de observación.

La utilización de placebos como controles ha desempeñado un papel importante en el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. Sin embargo, a medida que se van teniendo más tratamientos validados, aumentan las limitaciones éticas de su uso. Las ventajas metodológicas que aporta el placebo deben ponderarse en función del exceso de riesgo que soportan los sujetos que lo reciben.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

THE HISTORICAL DEVELOPMENT OF CLINICAL THERAPEUTIC TRIALS. J. P. Bull en *Journal of Chronic Diseases*; 10 (3): 218-248, 1959.

ETHICS AND REGULATION OF CLINICAL RESEARCH. R. J. Levine. *Urban and Schwarzenberg*, 2.ª ed., Baltimore, 1986.

PLACEBO: UN MEDICAMENTO QUE BUSCA LA VERDAD. B. Lachaux y P. Lemoine. Interamericana-Mc Graw Hill, Madrid, 1989.

FUNDAMENTOS DE BIOÉTICA. D. Gracia, EUDEMA, Madrid, 1989.

CLINICAL TRIALS, A PRACTICAL APPROACH. S. J. Pocock. John Wiley and Sons, Chischester, 1993.

Shawn Carlson

Los secretos de la mariposa monarca, revelados

Nunca deberíamos subestimar el interés de las conversaciones fortuitas. El pasado invierno me hallaba en Monterrey, una hermosa ciudad californiana. Tomé un taxi. El conductor no paraba de hablar. Y me preguntó por mi profesión. Al mencionarle mi relación con los aficionados a la ciencia, soltó categórico: “Ah, usted debe de ser uno de esos que andan con la mariposa monarca”. Cuando le respondí que no sabía de lo que me estaba hablando, dio un volantazo. “Déjeme llevarle”, añadió con resolución.

Tras algunos rodeos alcanzamos una calle ancha. Dobló de nuevo y, por fin, se detuvo con un frenazo. “Aquí es”, dijo, mientras señalaba con el dedo un eucalipto añoso. Me quedé desconcertado hasta que vi lo que parecía una hoja desprendida revoloteando por una rama. Desenfundé mis fieles prismáticos y escudriñé morosamente el follaje. Había centenares, si no miles, de mariposas monarca aposentadas en el árbol esperando el calorcillo de la salida del sol. “Hacia media tarde se convierte en algo bastante más movido”, me informaba mi nuevo amigo. Desde entonces me he convertido en un entusiasta de la mariposa monarca.

En América del Sur *Danaus plexippus* sólo es una mariposa corriente, pero los duros inviernos han modelado la variedad norteamericana hasta convertirla en uno de los animales más notables de este continente. En América del Norte la mariposa monarca es el único insecto capaz de emigrar cada año hacia el norte y hacia el sur, lo mismo que las aves. Desde finales de agosto y durante todo octubre, millones de ellas se dirigen hacia el sur desde puntos de partida tan septentrionales como el mismo Canadá. Las que viajan al oeste de las Montañas Rocosas, superan el invierno en la costa del Pacífico, desde Los Angeles a Monterrey. Las que vagabundean por la ruta oriental se alojan en sólo 10 pequeñas parcelas de abetales en las montañas del centro de México. Algunas mariposas viajan 4000 kilómetros hasta alcanzar sus refugios de invierno: una proeza sin duda impresionante para un insecto que escasamente pesa medio gramo.

Además, ningún individuo vive lo suficiente para cerrar el ciclo migratorio. Los que sobreviven al invierno realizan la cópula en el viaje de vuelta. Sin embargo, como para las mariposas el sexo es, con diferencia, más letal que los rigores de un largo viaje, las curtidas viajeras mueren pronto. La progenie continúa el viaje que iniciaron sus padres, pero muchos individuos también copulan, ponen huevos y fallecen en el camino. En cubrir, pues, un ciclo migratorio entero, intervienen de tres a cinco generaciones de mariposas.

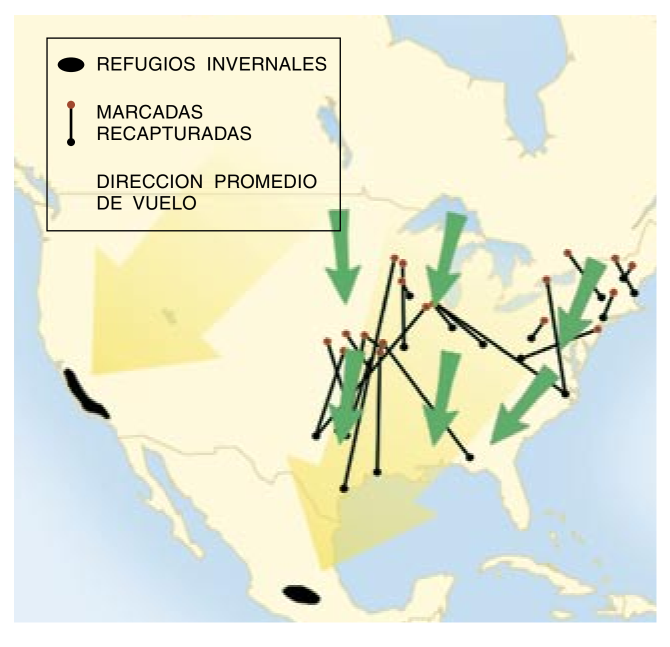
La ciencia carece todavía de explicación sobre los motivos por los que las mariposas monarca de Sudamérica no emigran. Ignora también, lo que complica más la cuestión, por qué emigran sus primas de Australia, siendo así que la especie se introdujo allí. Por lo demás, no es que se sepa mucho acerca de cómo se las arreglan en Norteamérica para llevar a cabo su odisea anual. ¿Cómo perciben que han de abandonar sus hogares veraniegos para ir hacia el norte? ¿Qué factores hacen cambiar sus instintos reproductores cuando viajan hacia el sur, para tornarlas sexualmente activas en el viaje de vuelta? Por último, no habiendo visitado nunca sus refugios de invierno ¿cómo es que siempre encuentran el camino para hallarlos? Son preguntas cuya respuesta nadie tiene.

Ello no obsta para que podamos sondear tales misterios sirviéndonos de equipos baratos y algo de determinación; en definitiva, un campo abonado para el trabajo del aficionado. En el mes de julio dediqué la sección a la captura y cría de mariposas. En esta ocasión completaré las nociones de lepidopterología haciendo parada en algunas líneas de investigación que, dirigidas por profesionales, están abiertas a la participación general.

1. Las mariposas monarca norteamericanas se refugian en las mismas áreas cada invierno; acuden de preferencia a determinados árboles

Por lo que a nuestra mariposa y a Norteamérica concierne, sobresale el proyecto “Seguimiento de la monarca”, coordinado en la Universidad de Kansas en Lawrence. (Es un trabajo extrapolable a otros lares.) Aunque tiene escasamente 5 años de vigencia, la organización puede presumir de contar con 1500 miembros remunerados. Ofrece, asimismo, un programa escolar en el que se hallan comprometidos otros 100.000 estudiantes y maestros. Número tan alto de aficionados recaba muchísimas más observaciones que las que podrían recoger los profesionales por su cuenta.

Muchos de los voluntarios del proyecto de seguimiento de la monarca participan en el programa de marcaje. En ese marco, capturan decenas de miles de mariposas y las marcan una a una con un trocito de papel adherido a la cara inferior de una de las alas posteriores; en el papel están escritos la fecha y lugar de su captura.



2. Las poblaciones orientales y occidentales de la mariposa monarca se separan (flechas amarillas) *durante sus migraciones otoñales. Las mariposas orientales se dirigen, en promedio, hacia el centro de México; mientras que sus compañeras occidentales lo hacen hacia California. Las líneas negras muestran los casos de mariposas marcadas y recapturadas por el proyecto de seguimiento de la monarca en 1996*

De las 90.000 mariposas marcadas ya, sólo han vuelto a capturarse por segunda vez 137. Sin embargo, esas capturas, junto con datos de investigaciones previas de seguimiento de la especie, han revelado hechos sorprendentes acerca de las migraciones de la mariposa monarca. De entrada, no parece que exista sólo una ruta. Unas mariposas marchan rumbo a México, mientras que otras se dirigen hacia el sudeste y vuelan hacia las Carolinas. ¿Se habrán acaso perdido? ¿Vuelan mar adentro y mueren? ¿Siguen tal vez la costa y alcanzan finalmente México? Con un mayor número de marcajes el proyecto de seguimiento de la monarca nos traerá las respuestas.

El proyecto explora también la posibilidad de seguimiento de mariposas utilizando varias clases de marcaje mediante productos químicos naturales, indicadores de la procedencia de los individuos. Este año, los voluntarios criarán larvas alimentadas con plantas nativas (asclepias) que hayan crecido con el agua de lluvia local. Enviarán mariposas adultas a la Universidad de Kansas para verificar los análisis pertinentes. Los investigadores confían en identificar una rúbrica química que delate el lugar de origen de la mariposa. Así, muestreando los insectos migradores en diferentes localidades, se podrán determinar con precisión las rutas migratorias. El año pasado los colaboradores del proyecto criaron mariposas de este modo en 86 localidades diferentes. Hacia finales del presente año, los organizadores confían en cubrir toda el área de Norteamérica al este de las Montañas Rocosas.

Entonces, quizá puedan investigarse con métodos científicos nuevos secretos del sistema de navegación de la mariposa monarca. Los observadores del proyecto de seguimiento ya han descubierto una de las claves por las que se guían esos grandes voladores. Empezaron por separar en dos cajas un grupo de ejemplares migradores que habían capturado. Usando luz eléctrica para imitar la luz del día natural, los investigadores “retrasaron el tiempo” en uno de los grupos, demorando el ciclo de luz para que empezara 6 horas después del alba. El otro grupo, que sirvió de control, se mantuvo en las condiciones naturales de ciclo de luz. Transcurridas dos semanas de habituación, se liberaron las mariposas a lo largo de varios atardeceres soleados y registraron la dirección del vuelo.

La ruta preferente hacia los lugares de invernada resultó ser algo al oeste del eje norte-sur. Por la mañana, esta dirección cae al oeste de la posición del sol; por la tarde, al este del sol. Las mariposas control percibían que era por la tarde y se encaminaron hacia su destino en la dirección correcta. En cambio, las mariposas “con la hora retrasada” creyeron que era por la mañana y volaron hacia el noroeste, lejos de situarse al oeste de la posición del sol. Este resultado demuestra de forma palmaria que las mariposas monarca están preparadas para orientarse, al menos en parte, sincronizando sus relojes internos con la posición del sol.

Sin embargo, esa habilidad no explica toda la historia. Al fin y al cabo, las monarcas parecen perfectamente capaces de navegar incluso bajo cielos nubosos. De hecho, las mariposas puede que estén siguiendo el campo magnético de la Tierra o los contornos del terreno. Las respuestas aguardan a cualquier investigador suficientemente astuto —profesional o aficionado— que sea capaz de descubrirlas.

El lector puede seguir las técnicas de cría de la monarca descritas en la sección de julio, para hacer sus propios experimentos. Especialistas implicados en el programa de seguimiento de la monarca mantienen hasta 150 mariposas en un espacio de aproximadamente un metro de lado. Para reproducir sus éxitos, se aconseja articular 12 bastones ajustables y formar un cubo de un metro de lado; el techo se cubre con una lámina de plástico rígida y transparente. Hay que dejar sitio para una ventana de plástico transparente en la cara frontal, cuya tela debe quedar asegurada en los postes mediante tiras de velcro.

Se requiere poder controlar luz y temperatura. Necesitaremos luces que cubran todo el espectro. Los investigadores del proyecto de seguimiento de la monarca utilizan 10 fluorescentes G.E. de luz diurna situados 15 centímetros por encima

de cada una de las jaulas. Usese un temporizador para encender y apagar las luces a intervalos alternos de dos horas empezando a las 6,30 de la mañana, hasta su apagado final por la noche a las 22,30 horas. Todo ello suma 16 horas de día, con pausas de obscuridad que propician unas buenas condiciones para la alimentación y la cópula. Mantendremos la temperatura entre 23 y 27 grados centígrados. Alimentaremos las mariposas con una disolución de azúcar disuelto al 20 por ciento en agua, sazonada con una pizca de polen de abeja (que puede adquirirse en cualquier establecimiento local de comida de régimen), el cual proporcionará los necesarios aminoácidos.

Un recipiente plástico relleno de material fibroso, y que se sitúe en el centro del plato que contiene el agua azucarada, hará las veces de una elegante flor donde puedan beber las mariposas. Habrá que cambiar cada día el agua azucarada y esterilizar el recipiente plástico (o bien podemos servirnos de soluciones que no se estropeen).

En el campo, las mariposas monarca depositan sus huevos en las asclepias. En cautividad también prefieren dichas plantas, pero un papel de color verde puede simular una asclepia artificial, siempre y cuando las mariposas perciban que contiene los hidratos de carbono con que sustentar a su prole. Si no hay asclepias a mano, tendremos que propiciar la oviposición en las jaulas disponiendo tiras de papel secante de color verde que hayamos impregnado con solución azucarada con polen, y después secado. Las larvas, sin embargo, deben criarse sobre asclepias. (*Véase la sección de julio para más detalles sobre la cría de orugas.*) Si no disponemos de estas plantas en nuestro medio, el proyecto de seguimiento de la monarca ofrece las semillas. Cuando las larvas hayan llegado al estado adulto, las incorporaremos en los experimentos del proyecto de la monarca, o podremos poner a prueba nuestras propias teorías sobre el comportamiento de estos fascinantes insectos.

Para información sobre actividades adecuadas para aficionados puede escribirse a "Society for Amateur Scientists, 4635 Clairemont Square, Suite 179, San Diego, CA 92117, USA". También puede visitarse la página de la red: www.thesphere. com/SAS/, llamar al 619-239.88.07, o dejar un mensaje en el número 800-873.87.67.

JUEGOS MATEMÁTICOS

Ian Stewart

Imperios y electrónica

El mes pasado echamos un vistazo a los problemas de coloreado de mapas. Aunque frívolos en apariencia, los aspectos matemáticos que bajo ellos subyacen no carecen de utilidad. Los mapas guardan relación con los grafos, que son diagramas en los que un conjunto de nodos están conectados por líneas llamadas lados. Noción de espesor del grafo, deducida de los imperios en la Tierra y en la Luna, que ha resultado útil en la fabricación de circuitos impresos, utilizados en electrónica. El enlace se establece en un artículo de Joan Hutchinson, del Colegio Macallester de Saint Paul, en Minnesota, publicado en el número de octubre de 1993 de la revista *Mathematics*.

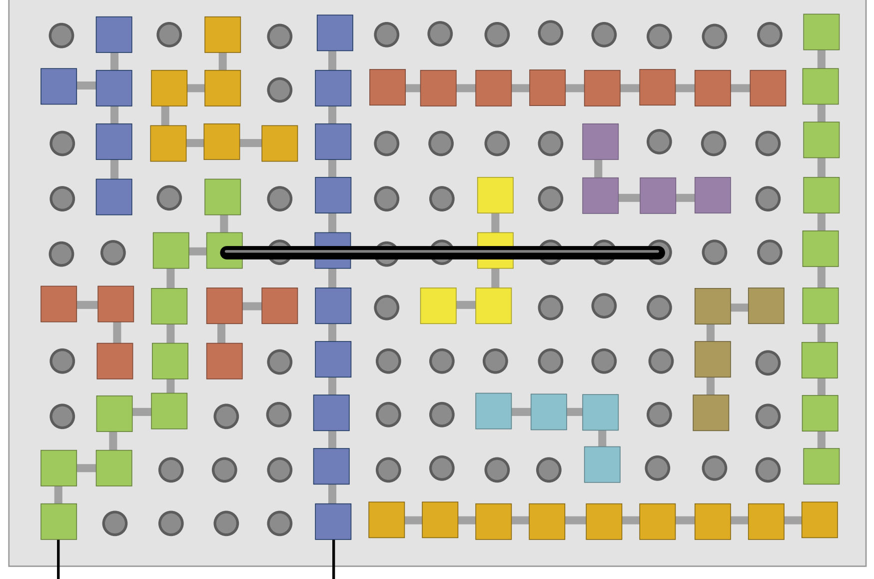
La aplicación fue descubierta por investigadores de los Laboratorios AT&T Bell, en Murray Hill, New Jersey. Recordemos que un grafo es planar si puede dibujarse en el plano sin que haya lados que se corten. El siguiente estadio, en sentido ascendente, corresponde a los grafos de espesor 2, cuyos lados pueden clasificarse en dos conjuntos, de manera que cada uno de esos conjuntos constituya un grafo planar. Un grafo tiene espesor tres si sus lados pueden separarse en tres de tales conjuntos, y así sucesivamente.

Podemos ver en un grafo de espesor dos una especie de emparedado. En una de las rebanadas de pan se dibujan los lados del primer conjunto, sin que ninguno de ellos se cruce; dibujamos el resto de los lados en la segunda rebanada, sin cruces, como antes. Los nodos, prolongados en sentido vertical, forman el relleno o entrepán. Un grafo que requiere t capas de pan tiene espesor t.

Pensemos, para empezar, en los circuitos electrónicos como grafos por derecho propio. Los nodos son los componentes electrónicos, y los lados, conexiones eléctricas. Si el circuito ha de construirse en una de las caras de una tarjeta de circuito impreso (TCI), su grafo será planar forzosamente, para evitar cortocircuitos. Si se utilizan ambos lados de la tarjeta —lo que equivale a usar las dos rebanadas del sandwich— dispondremos de grafos de espesor dos. Y el espesor del grafo puede aumentarse utilizando mayor número de tarjetas. Consideraciones similares se aplican en el mundo de los microcircuitos en silicio, mucho más tecnificado, porque los circuitos de integración a muy gran escala (VLSI) han de construirse en capas.

Una tarjeta de circuito impreso consiste típicamente en una matriz o formación de 100×100 perforaciones, en las cuales se pueden instalar componentes, conectados por líneas horizontales y verticales, constituidas, normalmente, por estrechas tiras de material conductor llamadas "pistas". Las pistas hacen la función de hilos de conexión entre los componentes. A los fabricantes de tarjetas se les plantea el importante problema de la detección de tarjetas que tienen conexiones espurias: tramos de pista supernumerarios que conectan entre sí componentes eléctricos que no deberían estarlo.

Por razones prácticas, los fabricantes de tarjetas organizan los componentes agrupándolos en "redes". Una red es una colección de componentes conectados por pistas, las cuales nunca forman un bucle cerrado. El problema que aquí nos interesa consiste en determinar si dos redes distintas han quedado conectadas involuntariamente por un cortocircuito. La forma más evidente de averiguarlo consiste en revisar todos los pares de redes para ver si están conectadas. Podemos preparar un circuito que vaya desde una red al polo positivo de una pila y hasta la segunda red, desde el polo negativo, a través de



1. UNA TARJETA de circuito impreso contiene perforaciones (círculos) *a las que se fijan componentes eléctricos* (cuadrados). *Los componentes están interconectados mediante pistas metálicas, formando "redes"; las redes contiguas han recibido distinto color. Puede suceder que pistas no deseadas* (en negro) *provoquen fallos, al conectar indebidamente redes adyacentes. Si las redes verde y azul se conectan a sendas puntas de prueba y éstas, a una pila y una lamparita, el cortocircuito permitirá que fluya la corriente y la lámpara se encenderá*

una lamparita. Si ambas redes han quedado conectadas sin querer, se producirá un flujo de corriente y la lamparita fulgirá. De no ser así, la bombilla seguirá apagada.

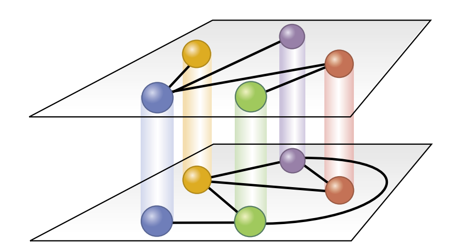
Desde luego, un dispositivo de verificación práctico se serviría de equipos electrónicos más refinados —por ejemplo, un ordenador conectado a un robot que automáticamente desechase los circuitos defectuosos— pero la idea es, en esencia, la explicada. La dificultad está en que con n redes, este método requiere $n(n-1)/2$ ensayos, que es el número de pares de redes. Dado que una cifra típica es la de unas 500 redes, resulta necesario hacer 125.000 verificaciones por tarjeta, cifra excesiva.

Pero al aplicar la noción de espesor de un grafo, el número de verificaciones puede quedar reducido a sólo 11. Y con un poco más de reflexión, ese número se reduce a sólo cuatro.

El punto de partida consiste en convertir el diseño de la tarjeta en un grafo que aporte información sobre cortocircuitos. A ese grafo le denominaremos "grafo redial" del diseño del circuito. Dado que estamos buscando cortocircuitos entre redes diferentes, asignaremos un nodo a cada red.

Los lados del grafo representan cortocircuitos posibles, no cortocircuitos reales (pues si supiéramos dónde se hallan éstos, no habría necesidad de comprobar la tarjeta). Por precisión: dos nodos del grafo redial estarán unidos por un lado siempre que las redes correspondientes sean "adyacentes"; ello significa que pueden conectarse por una línea recta horizontal o vertical que no pasa a través de una red intermedia.

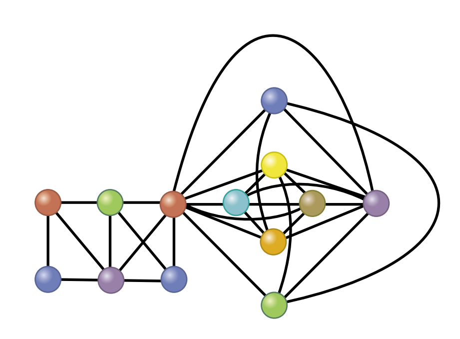
Evidentemente, un cortocircuito podría, en principio, conectar redes no adyacentes. Pero casi todos los cortocircuitos de ese tipo tienen también que conectar redes adyacentes. En el caso típico, el dispositivo de fabricación efectúa dos pasadas sobre la tarjeta: una para las conexiones horizontales y otra para las verticales. Los errores aparecen cuando se deposita un exceso de material conductor, que tiende, sin quererlo, puentes entre dos redes. A tales errores los llamaremos "defectos de fabricación". (Hay otras causas de que se produzcan circuitos defectuosos, pero son mucho más excepcionales, y aquí las desdeñaremos.) La línea extra de material conductor puede correr a lo largo de varias redes, pero dos de ellas serán, necesariamente, adyacentes. Bastará, pues, examinar tan sólo redes adyacentes.



2. "Sandwich" que representa un grafo de espesor 2: dos grafos planares, cuyos respectivos nodos se han convertido por estiramiento en tramos verticales

He dicho ya que el grafo de una tarjeta de circuito impreso tiene espesor dos, porque la tarjeta tiene dos caras. El grafo redial tiene también, por la misma razón, espesor dos. Pero según un teorema de un matemático inglés del siglo XIX, Percy John Heawood, todo grafo de espesor 2 puede colorearse con 12 colores. Es decir, es posible asignar a cada nodo un color elegido entre doce, de modo tal que los nodos conectados por lados sean siempre de distinto color. Así pues, el grafo redial de cualquier tarjeta puede colorearse con 12 colores. Podemos transferir (conceptualmente) este coloreado a las redes de la tarjeta del circuito impreso. Así pues, a cada una de las redes puede asignársele uno de los doce colores, y hacerlo de modo tal que nunca haya redes del mismo color que sean adyacentes.

Dado que estamos buscando cortocircuitos que conecten redes adyacentes, sabemos que podemos restringir nuestra búsqueda a los que puedan existir entre redes de distinto color. Podemos apilar juntas, por así decirlo, todas las redes del mismo color, en el sentido siguiente. Construimos una "punta de prueba" para cada uno de los doce colores, consistente en una estructura ramificada de material conductor que conecta todas las redes que sean de un mismo color.



3. El grafo redial correspondiente a la tarjeta de la figura 1 tiene espesor 2, pues la tarjeta consta de dos caras. Cada red está representada por un nodo; los nodos adyacentes están conectados por lados, que denotan posibles cortocircuitos

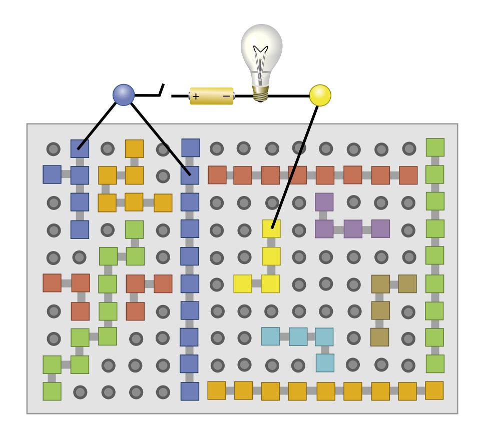
Supongamos que elegimos dos colores, por ejemplo, el azul y el amarillo. Conectamos las puntas de prueba azul y amarilla a la tarjeta, manteniéndolas separadas. Ahora conectamos una batería y una lamparita entre las dos puntas, y observamos si hay paso de corriente eléctrica.

Si se ha construido correctamente la tarjeta, no habrá paso de corriente, porque la punta azul solamente conecta con redes azules, la punta amarilla conecta sólo con redes amarillas y, en la tarjeta, ninguna red azul debería estar en contacto con ninguna red amarilla. En cambio, de existir algún defecto de fabricación que conecte una red azul con una amarilla, habrá circulación de corriente.

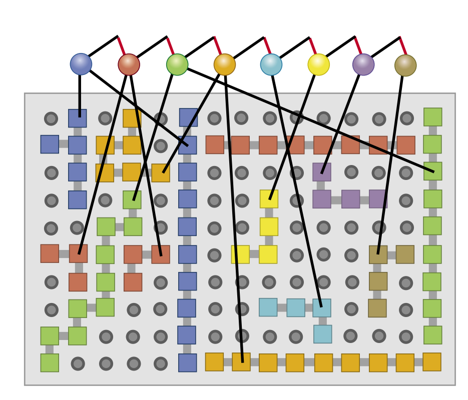
Observemos que esta prueba no nos dice dónde está el error. Pero como estamos desechando todos los circuitos impresos defectuosos (y no reparándolos), no tenemos necesidad de saberlo. La consecuencia inmediata es que, para detectar la presencia de un error de fabricación, basta con revisar todos los posibles pares de "sondas". Hay solamente 12 sondas, por lo que el número de tales pares es $12 \times 11/2 = 66$. En lugar de 125.000 verificaciones solamente hemos de hacer 66, un avance importante.

Sin embargo, podemos fácilmente mejorar más. Probemos la sonda número 1 con la número 2 y desechemos las tarjetas que indiquen conexiones entre ellas. Añadamos ahora una puerta o un conmutador para conectar las sondas 1 y 2. Ensayemos la sonda número 3, para ver si tiene conexión con el circuito formado por las sondas 1, 2 y la puerta. En caso afirmativo, es que la sonda conecta, o bien con la sonda 1, o bien, con la 2. Ambas eventualidades corresponden a errores, por lo que eliminamos la tarjeta. Añadimos ahora una segunda puerta que conecte la sonda 3 a las dos anteriores, y procedemos de igual manera. De esta forma, el número de comprobaciones se reduce a 11.

Allen J. Schwenk, de la Universidad West Michigan en Kalamazoo, cayó en la cuenta de que era posible llevar más lejos la reducción. Escribamos los números de 1 a 12 en el sistema binario: de 0001 a 1100. Numeremos las sondas correspondientemente. Construyamos una "supersonda" que co-



4. Una sonda interconecta todas las redes de un mismo color. Intercalando una lamparita y una pila entre las sondas azul y amarilla se puede detectar un cortocircuito entre las redes de esos colores



necte todas las sondas que comiencen por 0; hagamos otra con las que empiecen por 1. Comprobemos si existe conexión entre estas dos supersondas; en caso afirmativo, la tarjeta se desecha. Si no, creemos dos supersondas más conectando las que porten el mismo dígito binario en segunda posición y verifiquemos si existe continuidad entre ambas. Hagamos lo mismo con los lugares tercero y cuarto de los desarrollos binarios. Y eso es todo. Para comprender por qué funciona, observemos que, si dos sondas distintas están conectadas por un cortocircuito, sus expresiones binarias han de diferir en uno de los cuatro lugares, por lo menos, así que alguno de los ensayos detectará el error.

Una reducción de 125.000 ensayos por tarjeta a sólo cuatro bien merece tomarse en cuenta si la serie a producir es razonablemente grande, dado que es necesario construir estas complicadas sondas y supersondas sólo una vez para cada diseño circuital.

5. Puertas o conmutadores van conectando las sondas en serie, reduciendo así el número de pruebas de cortocircuito a efectuar

Acuse de recibo

La sección de junio estuvo dedicada a los tradicionales problemas de recorridos de caballo. Solomon W. Golomb, de la Universidad de Baja California, señala que él ha demostrado algunos de los resultados en un artículo, "Of Knights, Cooks and the Game of Cheskers" (*Journal of Recreational Mathematics*, vol. 1, n.º 3, páginas 130-138; julio de 1968). Entre ellos se cuenta un teorema atribuido a Louis Pósa —la inexistencia de recorridos en tableros de $4\times n$— y la existencia de circuitos cerrados en tableros de 3×10.

Andy Campbell, de West Hartford, recordó el problema del recorrido mágico de caballo. Se trata de un recorrido de caballo en el tablero de 8×8 que posee la siguiente propiedad: si las sucesivas posiciones del caballo se numeran de 1 a 64, los números forman un cuadrado mágico. (Es decir, todas las filas, las columnas y las diagonales tienen la misma suma.) No se podido establecer ni la existencia ni la inexistencia de cuadrados tales, pero sí se conocen varios "cuasi-aciertos":

(*a*) Un recorrido de caballo en el que todas las filas y columnas suman 260, aunque no ocurre así con las diagonales.

(*b*) Un cuadrado mágico formado por dos semirrecorridos de caballo (1 – 32 y 33 – 64), cada uno de los cuales cubre la mitad del tablero.

(*c*) Un recorrido mágico de rey.

46	55	44	19	58	9	22	7
43	18	47	56	21	6	59	10
54	45	20	41	12	57	8	23
17	42	53	48	5	24	11	60
52	3	32	13	40	61	34	25
31	16	49	4	33	28	37	62
2	51	14	29	64	39	26	35
15	30	1	50	27	36	63	38

15	20	17	36	13	64	61	34
18	37	14	21	60	35	12	63
25	16	19	44	5	62	33	56
38	45	26	59	22	55	4	11
27	24	39	6	43	10	57	54
40	49	46	23	58	3	32	9
47	28	51	42	7	30	53	2
50	41	48	29	52	1	8	31

61	62	63	64	1	2	3	4
60	11	58	57	8	7	54	5
12	59	10	9	56	55	6	53
13	14	15	16	49	50	51	52
20	19	18	17	48	47	46	45
21	38	23	24	41	42	27	44
37	22	39	40	25	26	43	28
36	35	34	33	32	31	30	29

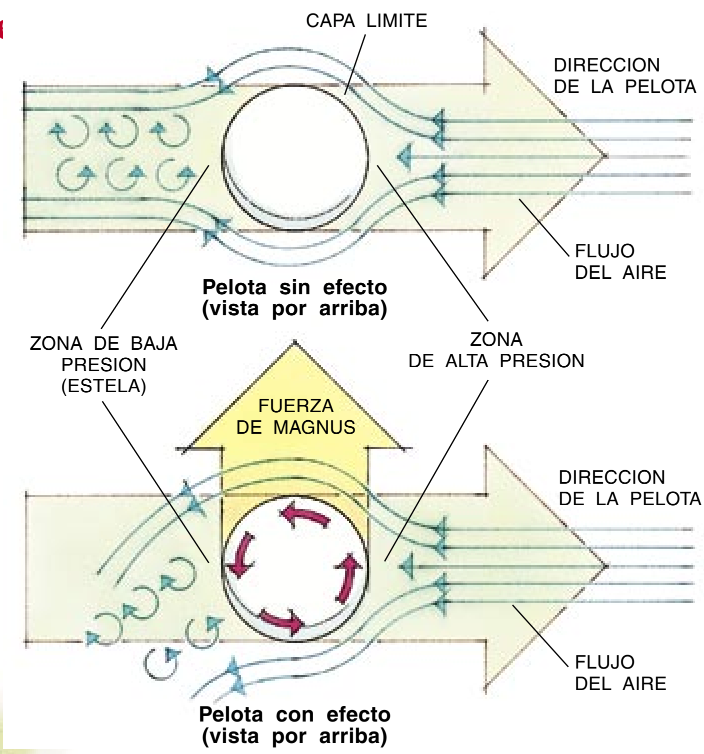
IDEAS APLICADAS

Alan M. Nathan

Lanzamientos

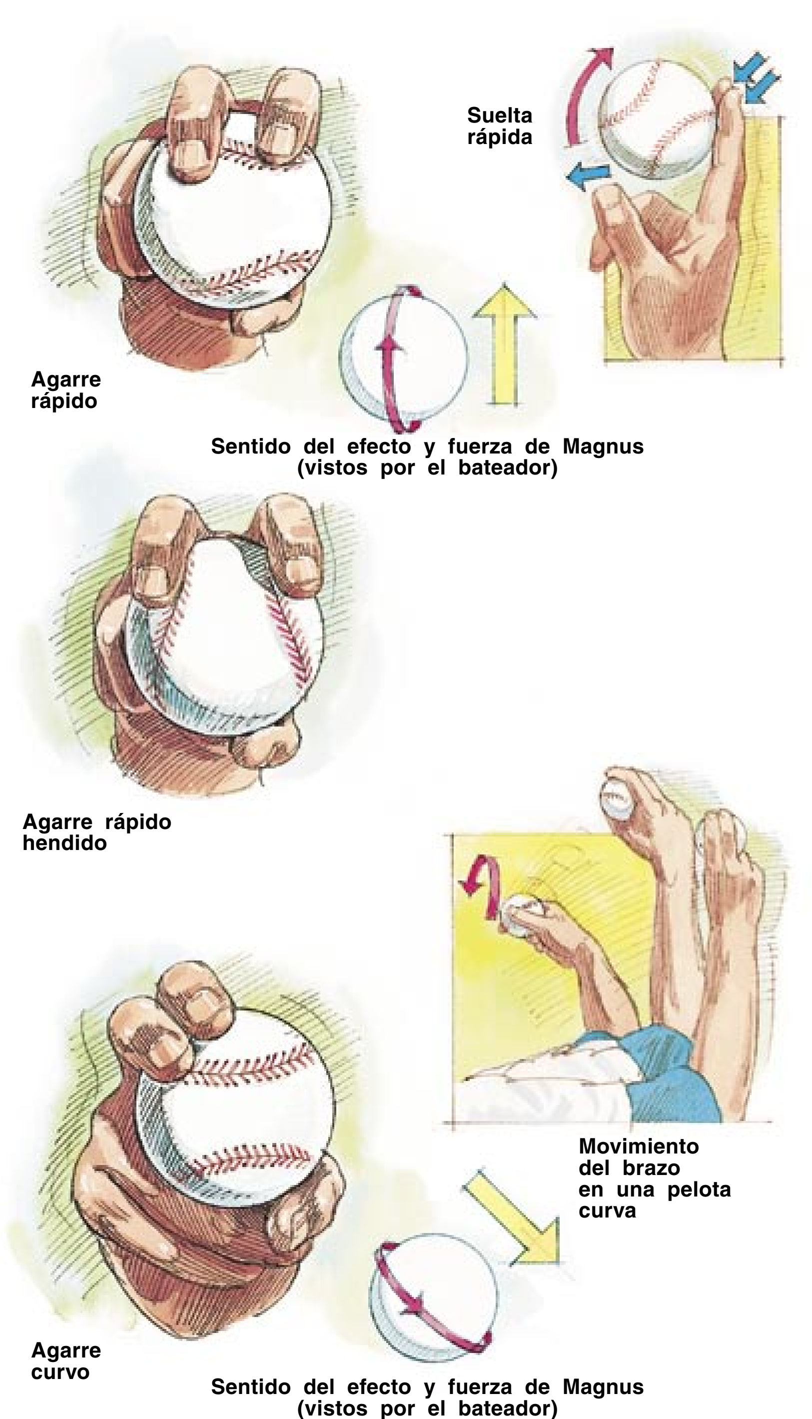
“Si atinar el golpe es cuestión de coordinación, lanzar la pelota es cuestión de desbaratar la coordinación.” Así se expresaba Warren Spahn, posiblemente el mejor lanzador zurdo de todos los tiempos. Un lanzador experto sabe desbaratar la coordinación del bateador alterando la trayectoria de la pelota de una manera inesperada para éste. Si al béisbol se jugara en el vacío, a los lanzamientos sólo los afectaría la atracción gravitatoria. La trayectoria resultante sería completamente predecible y ningún bateador experimentado podría ser engañado.

Pero el juego se desarrolla en canchas abiertas. Gran parte de las sutilezas del lanzamiento procede de la interacción entre la pelota y el aire circundante. En efecto, el arte del lanzamiento es en gran medida el arte de influir en el flujo del aire que rodea a la pelota, al objeto de crear pequeños desequilibrios en la presión del aire, desequilibrios que entonces alteran la trayectoria de la pelota de un modo que el lanzador pueda controlar.



1. AERODINAMICA DE UN LANZAMIENTO. Una pelota en movimiento perturba el flujo del aire en su vecindad. El aire sigue una trayectoria en parte aerodinámica en torno a la pelota, formando una delgada “capa límite” adherida a la superficie. Pero la forma de la pelota y las fuerzas de rozamiento se confabulan para desprender esa capa de la superficie dejando atrás una turbulenta estela de baja presión (*arriba, ilustración superior*). Como resultado, se rompe el tenue equilibrio entre la presión del aire en el frente de la pelota y en el reverso de ésta, generándose una fuerza de resistencia que se opone al movimiento de la pelota. Cuanto más rápido sea el flujo del aire, mayor será la resistencia.

Hay que considerar asimismo el efecto, o giro interno, de la pelota. Para una pelota con efecto antihorario (visto desde arriba), el flujo del aire va más rápido por el costado derecho de la pelota (con respecto al lanzador) que por el izquierdo (*abajo, ilustración superior*). En el costado rápido, la capa límite se separa más adelante corriente arriba, desviando la estela hacia la derecha. Según la ley de acción y reacción de Newton, el aire ejerce sobre la pelota una fuerza opuesta y el bateador ve a la pelota desviarse de izquierda a derecha (*ilustración izquierda*). Esta fuerza, debida al llamado efecto Magnus, es responsable del “brinco” de las pelotas rápidas ascendentes y del cambio de dirección en las pelotas curvas y planas. El efecto Magnus aumenta con la rotación.



2. PELOTA RAPIDA. El modo natural de lanzar una pelota rápida es con contragiro, efecto producido por el rozamiento entre los dedos y la pelota y sus costuras. En razón del contragiro, la fuerza de Magnus se opone a la gravitatoria, dando lo que erróneamente se llama pelota rápida ascendente. Por sí sola la gravedad haría que una pelota a 150 km por hora descendiera menos de un metro entre la plataforma del lanzador y la meta. Con un efecto habitual de 1600 rpm, la fuerza de Magnus es sólo del orden de un veinte por ciento de la gravitatoria, por lo que la pelota desciende sólo unos 0,7 metros. (Para que una pelota rápida ascienda, la fuerza de Magnus debería ser mayor que la gravitatoria, algo poco probable, aunque una pelota rápida que descienda menos que lo esperado pueda parecer que brinca.) Un lanzador hábil puede dificultar la tarea del bateador haciendo que varíe la velocidad de rotación para controlar así el descenso de la pelota. Una variante muy extendida de este truco la tenemos en la pelota rápida hendida, que se lanza asiendo la pelota con los dedos muy separados, reduciéndose así la tendencia natural a comunicar contragiro a la pelota. Con muy poco efecto y algo menos de velocidad, la pelota desciende entre quince y treinta centímetros más que una pelota rápida normal. Si la vista del bateador no percibe que la pelota lleva menos efecto, aquel se engañará creyendo que la pelota llegará a la meta más alta y su golpe pasará por encima de la pelota.

3. PELOTA CURVA. Esta se lanza con más efecto que la rápida, hasta con 1900 rpm, con lo que la fuerza de Magnus es mayor. Se lanza además con menos velocidad, habitualmente entre 110 y 120 km por hora, otorgando más tiempo de actuación a la fuerza de Magnus y engendrando una desviación mayor. Normalmente, el efecto es de sobregiro y giro lateral combinados, con lo que la pelota se desvía a la vez de costado y hacia abajo hasta unos cuarenta centímetros. Para ponerle peor las cosas al bateador, la mitad de la desviación tiene lugar a lo largo de los últimos cinco metros del trayecto de veinte metros hasta la meta, creando la ilusión de que la pelota "va a caer fuera de la mesa". Una variación es la pelota plana, que se lanza ligeramente más rápida y con más giro lateral que sobregiro.

PELOTA RAPIDA ASCENDENTE
PELOTA RAPIDA CON MANO HENDIDA
PELOTA CURVA

TRAYECTORIAS en los tres lanzamientos comunes.

Técnica

Materiales escogidos

TECHNOLOGICAL CHANGE. METHODS AND THEMES IN THE HISTORY OF TECHNOLOGY. Dirigido por Robert Fox. Harwood Academic Publishers; Amsterdam, 1996. **SCIENCE AND CIVILISATION IN CHINA**. vol. V: 6, por Joseph Needham y Robin D. S. Yates. Cambridge University Press; Cambridge, 1994.

THE QUEST FOR LONGITUDE. Dirigido por William J. H. Andrewes; Harvard University Press; Cambridge, 1996. **ENGINEERING THE REVOLUTION. ARMS AND ENLIGHTENMENT IN FRANCE, 1763-1815,** por Ken Alder. Princeton University Press, Princeton, 1997. **THE CORRESPONDENCE OF JAMES JURIN (1684-1750)**, por Andrea Rusnock. Rodopi; Amsterdam, 1996.

SCIENCE IN THE MAKING. SCIENTIFIC DEVELOPMENT AS CHRONICLED BY HISTORIC PAPERS IN THE PHILOSOPHICAL MAGAZINE —WITH COMMENTARIES AND ILLUSTRATIONS. Compilación de E. A. Davis; Taylor and Francis; Londres, 1995-1997. **INFORMATION TECHNOLOGY AS BUSINESS HISTORY**, por James W. Cortada. Greenwood Press; Westport, 1996.

Por mucho esfuerzo empeñado en lucubrar sobre la naturaleza y función de la técnica, buscándosele incluso un estatuto epistemológico de rango filosófico, lo cierto es que, si nos atenemos al crisol de los resultados, no ha superado el sentido que tuvo siempre de aplicación de la ciencia. No encierra ello ningún demérito. En particular, si se trata de una aplicación que, a su vez, nos lleva a ahondar en el conocimiento básico o insta cambios en la economía y la sociedad.

En el marco general de las transformaciones promovidas por la innovación técnica nos introduce *Technological Change*, de cuyo manojo de colaboraciones importa destacar la dedicada a una obra y a un autor que rasgó el velo de obscuridad que celaba el mundo creador del Medievo europeo. El libro, de Lynn White, lleva por título *Medieval Technology and Social Change*. El volumen, aparecido en 1962, sorprendió a historiadores, archiveros y documentalistas de cejas quemadas entre cartularios y protocolos notariales. Si éstos no lo recibieron con aplauso, su planteamiento sugerente, destilado de una rebusca arqueológica, entusiasmó a la grey entonces minúscula de historiadores de la ciencia y la técnica.

White proponía que la técnica medieval no fue sólo un aspecto del desarrollo económico, sino también el motor de su libertad. Ejemplificaba su tesis en la invención del estribo. Con esa pieza la caballería —la de Carlos Martel contra los árabes— podía luchar de una forma nueva; afirmada la lanza bajo el brazo, el golpe asestado redobablaba su potencia. Tras el estribo vendría la silla de montar con respaldo, la doble cincha y el peto.

La agricultura, por su parte, se mecanizó y racionalizó. Aparecieron, o reaparecieron, los arados de rueda, se extendió el sistema de rotación de los cultivos, se estercolaron los campos y se aprovechó la fuerza de los animales de tiro para el transporte y el drenaje de zonas pantanosas. Hubo mucho más. Molinos de agua y de viento aportaron la energía para la molienda del grano. Batanes, fraguas y aserradoras se aprovecharon del dominio técnico de la fuerza del agua.

¿Qué ocurría entonces en Oriente? A la técnica militar de la China antigua y medieval se consagra el volumen quinto de *Science and Civilisation*, obra monumental de Joseph Needham, que en este tomo contó con la colaboración de Robin D. S. Yates, Krzysztof Gawlikowski, Edward McEwen y Wan Ling. Gawlikowski ha desentrañado el saber militar chino encerrado en el un tanto críptico *Sun Tzu Ping Fa* ("El arte de la guerra del maestro Sun"), McEwen es consumado arquero y ballestero y Ling conoce la historia de las máquinas de artillería que prepararon el advenimiento del cañón.

En todos los tiempos y lugares, la logística de la guerra estimuló el refinamiento de la técnica. La búsqueda perenne de metales más duros indujo el tránsito del bronce al acero pasando por el hierro. No sólo había que forjar armas más contundentes que las del enemigo, sino defenderse también con corazas impenetrables que sustituyeran los cueros o las mallas de madera y bambú. Lo que los metalúrgicos comenzaron, prosiguieron los químicos con la pólvora. Expuesta la épica de la pólvora en un tomo precedente, van pasando por estas páginas la estructura y evolución de arcos, ballestas, catapultas, trabuquetes y otras piezas de artillería.

Del arco los chinos medievales ponderaban su ligereza, armonía, tenacidad, sonoridad y precisión del tiro. Fabricaban el arma con tendones, madera, asta y corcho. Característica de su método de disparo era el "tiro mongol", que requiere la anudación del pugar. Manejaban diversos tipos de ballesta, unos ligeros y de corto alcance, para el ataque y defensa de muros; otros, más pesados y de largo alcance, en campo abierto. Para montar el arma, tiraban con fuerza de la cuerda mientras retenían el arco con el pie. Incorporaron la mira con escala graduada. Por dos veces, parece, llegó a Occidente la ballesta china; la segunda, en el siglo X d.C.

Needham bautiza con el latinismo "arcuballista" una poderosa ballesta montada en bastidor. El armazón portaba ruedas y permitía ajustar varias duelas de arco para aumentar la tensión y, por tanto, multiplicar la velocidad inicial del proyectil. Muy distintas eran las máquinas fundadas en la torsión de tendones, como cierta catapulta cuyos dos brazos, apresados, actuaban como un resorte al liberarse.

Chinos y europeos comparten en el Medievo la lucha de carros. Aunque se debate si fue idea europea exportada a Oriente, lo innegable es que el tipo chino poseía características propias. Los ocupantes del carro nunca eran menos de tres, con un arquero a la izquierda del conductor y un lancero a su derecha. El arquero llevaba un par de arcos reflejos y el lancero blandía armas rompedoras de los arcos del carro enemigo.

Progresaba la agricultura y avanzaba, aunque lenta, la industria. ¿Y en el mar? Hasta finales del siglo



Frontispicio de Le bombardier français; ou nouvelle méthode de jeter les bombes avec précision*, de Bernard Forest de Bélidor; París, 1731*

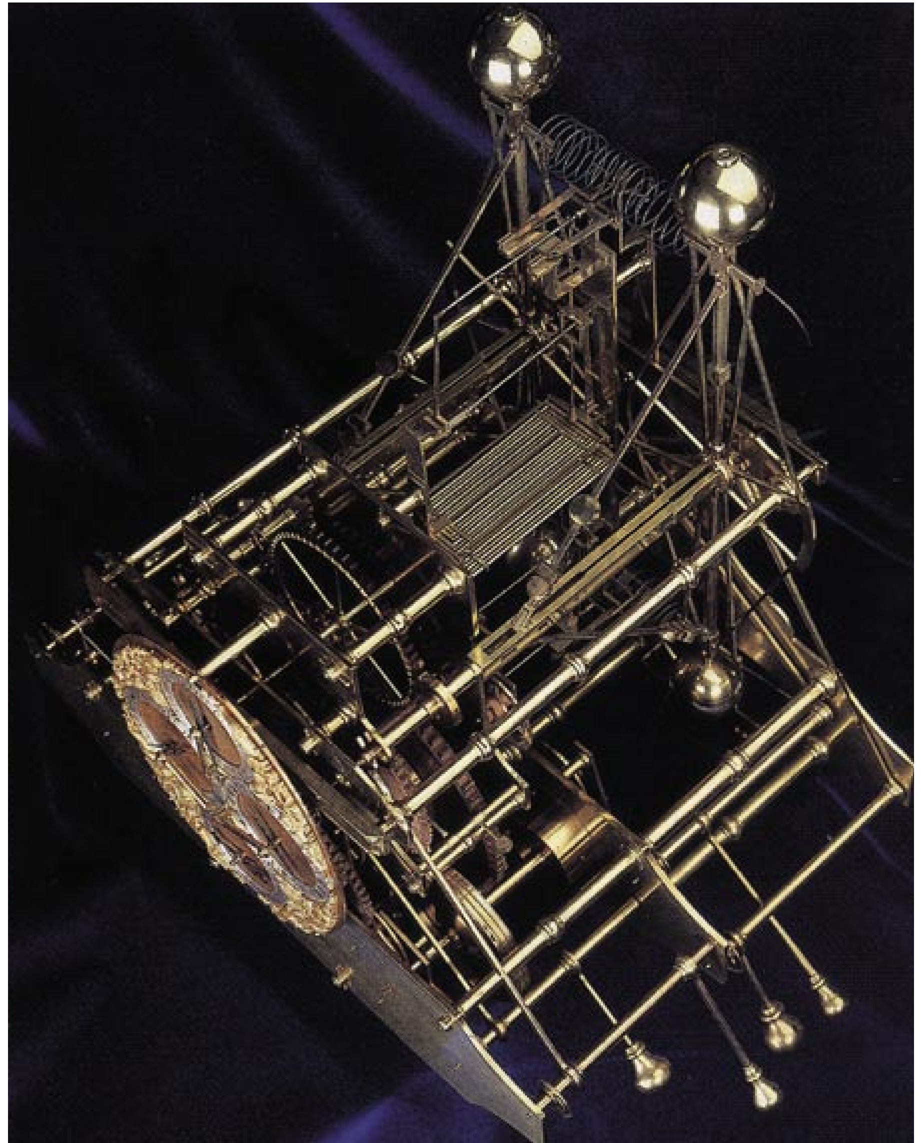
XV, la navegación era de cabotaje por aguas familiares. Pocos se atrevían a perder de vista la línea de costa. Contaban, por supuesto, con algunas claves para orientarse —estrellas de noche, de día el sol, aves migratorias, corrientes, vientos predominantes— y para inferir la proximidad de tierra firme —aves, cúmulos, restos de vegetación, profundidad, sabor y olor del agua—, que les permitía saltar de isla en isla. Mas, cuando las nubes ocultaban su guía celeste y las tormentas desviaban de su curso la embarcación, perdían la noción de dónde estaban y en qué dirección caía su punto de destino. La latitud del lugar podía restablecerse en cuanto despejara el firmamento; pero, ¿cómo saber la longitud?

Hace unos años se reunieron en Cambridge medio millar de expertos para debatir la historia del problema, con las connotaciones económicas, políticas y técnicas que su resolución comportaba. Para resumir de forma plástica el profundo cambio operado de entonces acá, Philip Morrison sacó una micromáquina electrónica del bolsillo, apretó un botón y leyó, ante los congresistas y en voz alta, "latitud: Norte 42 grados, 22,546 minutos; longitud: Oeste 071 grados, 06,904 minutos". Pero el receptor del sistema de posicionamiento global, exponente de la técnica moderna, no debe obscurecer el genio teórico y la habilidad artesanal derrochados en la tarea, magníficamente descritos e ilustrados en *The Quest for Longitude*.

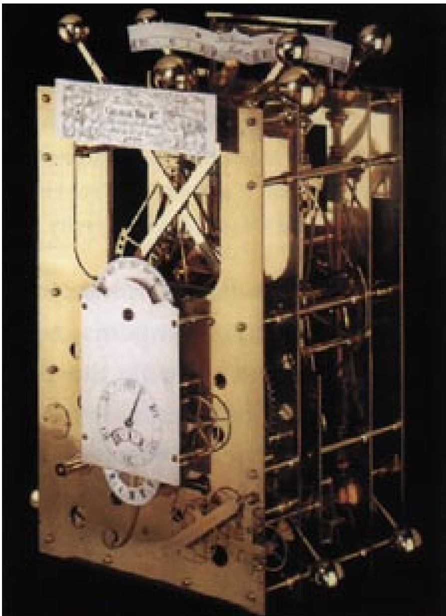
El héroe de la historia fue John Harrison (1693-1776), quien coronaba un empeño de siglos. Gemma Frisius sugería ya en 1530 que la diferencia de longitud entre dos lugares podría establecerse mediante un reloj exacto que midiera las diferencias horarias entre ambos sitios. En alta mar, el reloj habría de mantener durante el viaje el tiempo del meridiano de partida y resistir los cambios bruscos de temperatura y humedad, así como los bandazos del barco. Felipe II en 1567, Felipe III en 1598 y el gobierno holandés en torno a 1600 prometieron enriquecer a quien ideara un ingenio que ayudara a determinar la longitud. Entre los que respondieron a esa llamada, Galileo Galilei, quien pensó en un método fundado en la observación de los eclipses de los satélites de Júpiter.

A principios del XVIII los errores producidos por el desconocimiento de la longitud comportaban gravísimos reveses a la intensa actividad oceánica. En 1714 el parlamento londinense aprobó la Longitude Act que ofrecía una jugosa recompensa a quien lograra establecer un método preciso de determinación de la longitud. Isaac Newton y Edmond Halley formaron parte de la comisión británica. De todas las exigencias reclamadas a los instrumentos, ninguna más apremiante que las demandadas al reloj mecánico. Se le exigía funcionar 24 horas al día, 365 días al año, varios años. No se le admitía un funcionamiento de 99 por ciento, que daría un desfase diario de unos 15 minutos, ni siquiera del 99,99 por ciento, que daría una variación diaria de 8,64 segundos. Para alcanzar el premio más

H.1



H.2



H.3

sustancioso (20.000 libras) el reloj no podría sobrepasar una variación máxima de dos segundos.

En el camino hacia la solución se fueron refinando cronómetros e instrumentos de observación (octantes primero y luego sextantes), así como depurando los cálculos sobre predicción de órbitas lunares y comparación de distancias. Por fin, Harrison logró superar, en versiones cada vez más refinadas de su reloj, las limitaciones técnicas de temperatura y precisión que bloqueaban el desarrollo.

El método de la distancia lunar, así se llamó la otra solución, recurría a la observación astronómica. Descansaba en la predicción exacta de la posición de la Luna entre las estrellas. Puesto que las posiciones relativas de las estrellas fijas y la Luna cambian muy deprisa, se atendía a la distancia entre una estrella determinada y nuestro satélite. El método precisaba una tabla de tiempos locales de la distancia entre la Luna y ciertas estrellas en un punto de longitud conocida. Para calcular esas tablas se requería una teoría del movimiento de la Luna que facultara para predecir la posición de la Luna con respecto a las estrellas fijas con precisión suficiente. Uno de los grandes logros matemáticos del siglo XVIII fue el desarrollo de una teoría tal.

Un trabajo también minucioso, a caballo entre la artesanía y la técnica, aunque ahora en el campo de la medicina, fue el realizado por James Jurin (1684-1750), contemporáneo de Harrison. Su *Correspondence* nos permite seguirle en la defensa de la inoculación terapéutica de la viruela. Aduce que el método estadístico —que él introduce en medicina— nos revela que el riesgo implicado en la inoculación es inferior al que se expone quien rehúye la vacuna. De acuerdo con sus cálculos, las posibilidades de morir de viruela inoculada (1 en 50) eran muy inferiores a las posibilidades de morir de viruela natural (1 de cada 8). Basó sus estimaciones en los registros de mortalidad de Londres y de informes de Nueva Inglaterra.

Miembro destacado de la primera hornada de newtonianos, la de Colin MacLaurin, Richard Mead y Robert Smith, extendió la nueva teoría de fuerzas a la hidrodinámica, iatromecánica y capilaridad. Para medir, por ejemplo, la gravedad específica de la sangre instaló un tubo de cristal que contenía ese fluido en una bomba de

H.4



El premio de 20.000 libras fue ofrecido por el gobierno de la reina Anne en 1714. La extraordinaria precisión de los relojes de ruedas de madera hechos por John Harrison convencieron a Halley y a Graham de que merecía recibir subvención oficial del estado. Su apoyo pronto resultó en el primer reloj de Harrison (H.1), que demostró su valor en un viaje de prueba. Se dirigió a la Comisión de Longitud para que continuara financiando su proyecto. Dos años más tarde presentó el H.2. Pero Harrison no se sintió satisfecho y dedicó 19 años a crear su tercer prototipo (H.3), que refinó con el H.4. El reconocimiento del trabajo de Harrison tardó mucho en llegar, pues tenía que competir con el método de la distancia lunar

aire en la que se había hecho el vacío; a través del microscopio observó que los eritrocitos retenían su tamaño y morfología en dicho medio.

En los años en que fue secretario de la Regia Sociedad, Jurin proyectó una red ambiciosa de recogida de datos meteorológicos que recabarían aficionados de Europa y América del Norte. Y lo que revestía un interés único para la técnica: pugnó por normalizar instrumentos, mediciones y métodos de registro. Hacia 1720 la meteorología no era un campo de investigación desconocido. Christopher Wren y Robert Hooke habían intervenido en la construcción de higroscopios, anemómetros, pluviómetros y barómetros. En parte, el motivo de Jurin para acometer su proyecto partía de las ideas neohipocráticas que vinculaban el tiempo atmosférico con las enfermedades. La falta de instrumentos y mediciones normalizados constituía un grave inconveniente para llevar a buen término ese plan. Jurin urgía a sus corresponsales a construir tablas de conversión, por ejemplo, entre el palmo napolitano y el pie londinense, o el pie londinense y el pie sueco.

La normalización constituía la premisa necesaria para una transformación de los procesos artesanales en industriales, esto es, para la fabricación modular y en masa. Un primer paso, harto firme, se dio en Francia en el ocaso del antiguo régimen, explicado con verbosidad excesiva y desmesurada dispersión en *Engineering the Revolution*. Cumplió un papel central en ese giro el cuerpo de ingenieros de armamento y construcción, que supieron sacarle el máximo rendimiento a la ciencia de la balística, la derivación más inmediata de la mecánica racional pergeñada por Galileo y vertebrada por Newton. Para ello tuvieron que romper con el esquema rígido de Jean-Florent de Vallière, quien estableció en 1732 su famoso sistema de cinco clases de cañón de acuerdo con el peso de los proyectiles: 4, 8, 12, 16 y 24 libras. Bajo ningún pretexto podían las maestranzas desviarse en dimensiones y pesos de la regulación ordenada por el jefe de la artillería real.

Hasta que la Guerra de los Siete Años arruinó su validez. Los cañones franceses pesaban el doble que sus equivalentes prusianos, resultaban difíciles de maniobrar y se abandonaban en la retirada. Con la mitad de efectivos, Federico II doblegó al ejército galo. Ante ese hundimiento, Jean Baptiste Vaquette de Gribeauval redobló sus esfuerzos por reorganizar las baterías. Llegaron a los talleres, con bloques modulares, planos de nuevos cañones y revolucionarios mecanismos de disparo de los mosquetes. Y lo que revestía mayor interés, un repertorio de patrones que permitían sustituir de inmediato piezas estropeadas. La industria moderna, aunque fuera de guerra, echaba a andar.

Gribeauval prestó especial atención a la preparación matemática y física de sus artilleros, que muy pronto se familiarizaron con las obras de Benjamin Robins y Leonard Euler. Por lo demás, el cuerpo de ingenieros no tardó en convertirse en un verdadero poder en la sombra. La demanda de pertrechos militares alimentó la industria naciente. La guerra de asedio —en su labor de defensa o ataque— movilizó grandes capitales, mano de obra y habilidad técnica.

La sistematización de la técnica, engarzada con el progreso de la química primero y luego de la física, empezaba, sin embargo, a perfilarse por esos años allende el canal de la Mancha. Lo hacía a través de una publicación periódica, *Philosophical Magazine*, que abría su primer número, en julio de 1798, con una indicativa “Exposición de la patente de Mr. Cartwright sobre el motor de vapor”. Su influyente historia queda compilada en *Science in the Making*. *Scientific*

Development as Chronicled by Historic Papers in the Philosophical Magazine –with Commentaries and Illustrations, obra en dos volúmenes, el primero de los cuales abarca de 1798 a 1850 y el segundo desde este último año hasta 1900.

La revista puede considerarse el boletín oficial de la Regia Institución, fundada en 1799 para cubrir el campo de la técnica, desatendido por la Regia Sociedad. En sus páginas aparecieron artículos memorables de Humphry Davy, Michael Faraday y James Prescott Joule. Dio cabida también a traducciones consideradas de interés. Como lo fue sin duda el artículo que en el volumen de 1800 firmaba Alessandro Volta. Este escrito atrajo la atención hacia los fenómenos electroquímicos. W. Nicholson, A. Carlisle y W. Cruickshank publicaron en *Philosophical Magazine* cinco trabajos sobre el uso de la pila voltaica, más el descubrimiento de la electrolisis del agua. Generalizando el trabajo de Nicholson, Carlisle y Cruickshank, Davy demostró que el oxígeno y el hidrógeno podían producirse en vasijas de agua conectadas por filamentos de oro u otros hilos conductores (fibras musculares, por ejemplo).

Los antecedentes pertenecen al ámbito de la cultura general. Luigi Galvani, profesor de anatomía de la Universidad de Bolonia, había experimentado en los años ochenta del siglo XVIII sobre la agitación de las ancas de ranas en la proximidad de descargas eléctricas. Apoyado en esa y otras observaciones propuso la existencia de la "electricidad animal". Volta, profesor de Pavía, señalaba en 1792 que la fuente de la electricidad de Galvani no residía en la rana sino en el contacto entre metales e ideó los primeros prototipos de la pila que lleva su nombre. Davy vio que la acción de la pila de Volta dependía de la oxidación del zinc, propuso combinaciones más eficaces con ácidos entre las placas y armonizó las tesis en conflicto: la producción continua de electricidad no se debía ni al "mero contacto" (opinión de Volta) ni a ninguna "fuente animal oculta" (la de Galvani). Ambos tenían parte de razón: la fuente real era química.

Si la figura de Faraday llena el primer volumen, el segundo vive de Joule y su teoría de calor. También de las contribuciones de William Thomson (Lord Kelvin), beneficiario de 70 patentes. Fue Kelvin quizás el último renacentista. En ciencia básica, dejó su impronta en termodinámica, electromagnetismo, teoría cinética de los gases, hidrodinámica, geofísica y óptica. En ciencia aplicada, creó brújulas y sonares marinos y proyectó el tendido de cables transatlánticos.

Aunque se ha asimilado el curso seguido por el procesamiento de la información al comercio de la lana en la Edad Media, a la revolución industrial de los siglos XVIII y XIX y a la industria del automóvil después de la primera guerra mundial, lo cierto es que ninguna técnica ha empapado tanto el tejido social y económico a lo largo de la historia. Podemos aceptar la periodización que de su evolución esboza el autor de *Information Technology as Business History*: el intervalo entre 1945 y 1952 corresponde a la introducción de los computadores en centros oficiales y grandes empresas, de 1952 a 1965 se asientan los primeros prototipos industriales; de 1965 a 1981 transcurre una fase de adopción rápida en el sector de los servicios; por último, de 1981 hasta nuestros días se universaliza su empleo. Su rápida expansión halla explicación en que reduce la fuerza laboral, recorta los gastos y ofrece un producto mejor terminado.

Año	Coste en dólares por millón de instrucciones
1955	40,0
1961	2,0
1965	0,40
1971	0,11
1977	0,08
1981	0,02
1985	0,004

Evolución de costes del procesamiento

A esa graduación temporal ha acompañado cierta evolución de la terminología dominante. En los años cincuenta y sesenta, se hablaba de "procesamiento electrónico de datos" (EDP), reflejo del tránsito del procesamiento de la información hacia los ordenadores digitales electrónicos. Mediados los setenta, la expresión en uso era la de "sistemas de gestión de la información" (MIS), índice del cambio de la mera trituración de números a la toma de decisiones. En los años ochenta se acuña la expresión "tecnología de la información", que se asienta en el decenio de los noventa. Por lo que a los aparatos concierne, en los años treinta y cuarenta, había "calculadores"; más tarde llegaron los "ordenadores". Estos adquirieron con el tiempo una tamaño "mini" para achicarse en "micro" en los años ochenta.

La prehistoria no se pierde en la noche de los tiempos. A comienzos del XIX, las tablas de navegación se veían sometidas a continuas correcciones y añadidos en un trabajo tedioso e inacabable. Charles Babbage y otros se propusieron construir una máquina que aliviara de esa rutina agobiante. Durante los decenios centrales de la centuria, las compañías de seguros, ferroviarias y los gobiernos amontonaban cajas de información que crecían en complejidad y volumen; difícilmente lograban cumplir la misión auxiliadora que les estaba asignada. Urgía acelerar el proceso, mejorar la precisión y reducir costes. Así nacieron las máquinas de sumar, calcular y registrar. Ocupan un lugar central las tarjetas perforadas de Herman Hollerith, que permanecerían en uso a lo largo de más de 100 años.

Prosiguen los estudios de laboratorio que posibilitan, en el umbral de la segunda guerra, que los ingenieros pongan a punto el computador digital electrónico. Tras la invención, la disputa por la explotación. J. Prespert Eckert y John Mauchly pleitearon sobre derechos de patente con la Universidad de Pennsylvania para la que habían construido el ENIAC. En un proceso que repetirá con otros prototipos, fundaron luego su propia empresa, se la vendieron a Remington Rand, que, con su ayuda y liderazgo, construyó el UNIVAC I, el primer computador digital al alcance de muchos. Eso ocurría a comienzos de los cincuenta. Desde entonces la capacidad de procesamiento creció exponencialmente.

Entre 1939 y finales de los cincuenta, se perfilaron las arquitecturas de los ordenadores. Von Neumann se aplicó a su construcción. Son los años de los primeros pasos del soporte lógico; los años en que se configura el sistema operativo y los lenguajes de programación. A ellos les siguen la introducción de los computadores S/360 y S/370, junto con la aparición de los lenguajes de uso libre como APL, BASIC y Pascal.

Probablemente la mayor sorpresa en la historia del procesamiento de la información haya sido la velocidad y la fuerza con que el ordenador personal ha irrumpido en escena.

LUIS ALONSO

Seguiremos explorando los campos del conocimiento



EL DESCUBRIMIENTO DEL QUARK CIMA, por Tony M. Liss y Paul L. Tipton

Para hallar el sexto quark, hubo que provocar choques entre partículas con una energía muy por encima de la puesta hasta ahora en juego.

CONSTRUCCION DE PUERTAS CELULARES, por Hagan Bayley

Mediante el recurso a técnicas propias del ADN recombinante, la ciencia empieza a saber qué hacer para crear poros artificiales por donde puedan entrar fármacos y biosensores.

CORRER SOBRE EL AGUA, por James W. Glasheen y Thomas A. McMahon

El secreto de la estrategia que emplea el basilisco para correr sobre la superficie del agua se esconde en su remada.

LA VIDA EN LAS PROVINCIAS DEL IMPERIO AZTECA, por Michael E. Smith

Entre los aztecas el pueblo llano vivía con mucha más holgura y complejidad de lo que las historias oficiales pretenden dar a entender.

SILBIDOS DE ARENALES, por Franco Nori, Paul Sholtz y Michael Bretz

Aunque el fenómeno de las arenas silbantes se conoce desde hace siglos, apenas si se ha profundizado en su razón de ser.

ONDAS GRAVITATORIAS EN EL UMBRAL DEL S. XXI, por Jesús Buitrago y Evencio Mediavilla

En los primeros años del nuevo milenio entrarán en funcionamiento varios dispositivos para detectar las ondas gravitatorias. De confirmarse su existencia se abriría una nueva ventana para la observación del cosmos.

LOS ORDENADORES DE KONRAD ZUSE Y LA HISTORIA DE LA COMPUTACION, por Raúl Rojas

Konrad Zuse construyó en Berlín de 1936 a 1941 dos máquinas de cómputo a las que llamó Z1 y Z3. Aunque el diseño lógico de ambas era muy similar, construyó la primera con componentes mecánicos y la segunda con relés telefónicos.

GENES RESISTENTES AL SIDA, por Stephen J. O'Brien y Michael Dean

Se acaba de descubrir una propiedad genética que protege de la agresión del sida. Hay sospechas firmes sobre varias más. La medicina confía en esa nueva línea de investigación para acometer terapias preventivas.

